



Bioconversion fongique : application à la production d'un agent antitumoral : la 9-hydroxy ellipticine

Pascal Formisyn

► To cite this version:

Pascal Formisyn. Bioconversion fongique : application à la production d'un agent antitumoral : la 9-hydroxy ellipticine. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne; Université Claude Bernard - Lyon I, 1990. Français. NNT : 1990LYO1T026 . tel-00832339

HAL Id: tel-00832339

<https://theses.hal.science/tel-00832339>

Submitted on 10 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE

N° Ordre : 26.90

Année : 1990

THESE

présentée devant
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON I

pour l'obtention
du DIPLOME DE DOCTORAT

par
Pascal FORMISYN

BIOCONVERSION FONGIQUE
APPLICATION A LA PRODUCTION D'UN AGENT ANTITUMORAL:
LA 9-HYDROXY ELLIPTICINE

Soutenue le 7 Mars 1990

JURY

M. J. VILLARD, Président

M. J. BOURGOIS

M. H. BRAUER

M. C. COLLOMBEL

Mme E. FERNANDEZ

M. C. PIGEROL

M. C. TRAN MINH

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE

N° Ordre : 26.90

Année : 1990

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON I

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(avec Label Européen à titre expérimental)

par

Pascal FORMISYN

BIOCONVERSION FONGIQUE

APPLICATION A LA PRODUCTION D'UN AGENT ANTITUMORAL:

LA 9-HYDROXY ELLIPTICINE

Soutenue le 7 Mars 1990

JURY

M. J. VILLARD, Président

M. J. BOURGOIS

M. H. BRAUER

M. C. COLLOMBEL

Mme E. FERNANDEZ

M. C. PIGEROL

M. C. TRAN MINH

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université
1er Vice-Président Fédération Santé
Coordonnateur Fédération Sciences
Président du Comité de Coordination
Des études Médicales
Secrétaire Général

M. le Pr. P. ZECH
M. le Pr. L.M. PATRICOT
M. le Pr. R. UZAN

M. le Pr. P. ZECH
M. F. MARIANI

FEDERATION SANTE

UFR de Médecine GRANGE BLANCHE
UFR de Médecine ALEXIS-CARREL
UFR de Médecine LYON-NORD
UFR de Médecine LYON-SUD
UFR de PHARMACIE
UFR d' ODONTOLOGIE
INSTITUT de TECHNIQUES DE READAPTATION

DIRECTEUR : Mme le Pr. H. PELLET
DIRECTEUR : M. le Pr J.C. EVREUX
DIRECTEUR : M. le Pr. L.M. PATRICOT
DIRECTEUR : M. le Pr. H. DEJOURS
DIRECTEUR : M. le Pr. J. VILLARD
DIRECTEUR : M. le Pr. H. MAGLOIRE
DIRECTEUR : M. le Pr. ESSETTE

DEPARTEMENTS FEDERATION SANTE

Département de BIOLOGIE HUMAINE
Département d'INNOVATION et de la
COORDINATION PEDAGOGIQUE

DIRECTEUR : M. le Pr. P.A. BRYON

DIRECTEUR : M. le Pr. G. LLORCA

FEDRATION SCIENCES

Institut des SCIENCES DE LA MATIERE

Institut des SCIENCES DE L'INGENIERIE
ET DU DEVELOPPEMENT TECHNOLOGIQUE

Institut de CHIMIE ET BIOLOGIE
MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Institut d'ANALYSE DES SYSTEMES
BIOLOGIQUES ET SOCIO-ECONOMIQUES

Institut des SCIENCES ET DE LA TERRE, DE
L'OCEAN, DE L'ATMOSPHERE, DE L'ESPACE
ET DE L'ENVIRONNEMENT

UFR DES ACTIVITES PHISIQUES ET SPORTIVES

I.U.T. A

I.U.T. B

DIRECTEUR : M. le Pr. E. ELBAZ

DIRECTEUR : M. le Pr. G. FONTAINE

DIRECTEUR : Mme A. VARAGNAT - M.C.

DIRECTEUR : M. le Pr. J.M. LEGAY

DIRECTEUR : M. le Pr. S. ELMI

DIRECTEUR : M. J. CAMY - Assistant

DIRECTEUR : M. le Pr. GIELLY

DIRECTEUR : M. le Pr. J. PIVOT

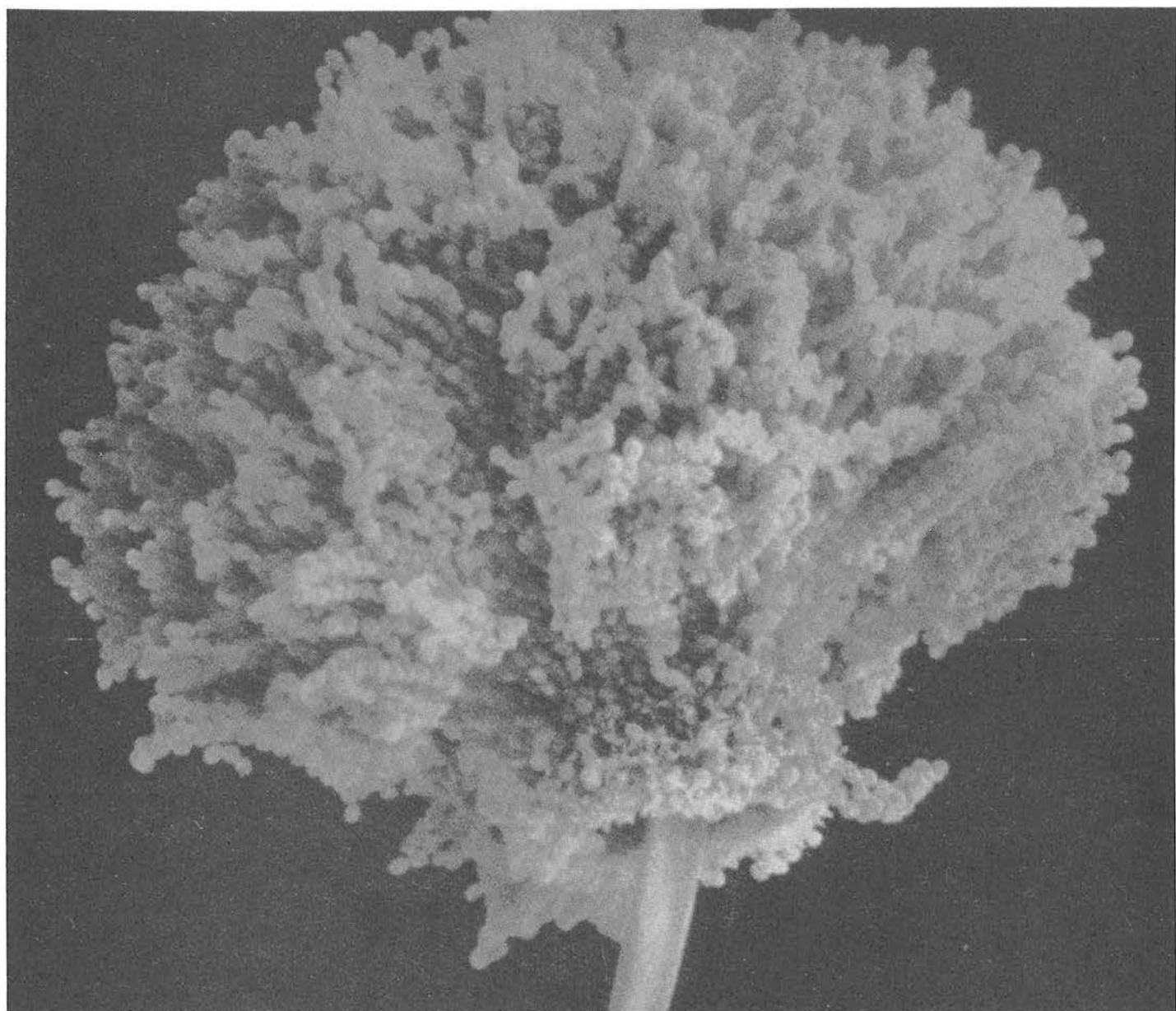
DEPARTEMENTS FEDERATION SCIENCES

Département de 1er cycle pluridisciplinaire
Sciences

Département de 2ème cycle
- Sciences de la vie et de la terre
- Sciences pour l'ingénieur
- Sciences de l'analyse et de la matière

DIRECTEUR : M. P. PONCET - M. C.

DIRECTEUR : M. le Pr. J.P. BLANCHET
DIRECTEUR : M. le Pr. P. BETHEAUX
DIRECTEUR : M. le Pr. J.L. VIALLE



IL N'EST POINT NECESSAIRE D'ESPERER POUR ENTREPRENDRE,
NI DE REUSSIR POUR PERSEVERER.

(GUILLAUME 1^{er} de NASSAU, Prince d'Orange, XVI^e siècle)

A DOMINIQUE, ARNAUD ET DAVID
AVEC TOUTE MON AFFECTION,

A MA FAMILLE,

A MES AMIS.

Il y a un an, décédait le professeur Maurice CARRAZ, directeur de l'Institut Pasteur de Lyon, qui avait accepté la direction de ce travail. En souvenir de son soutien et de ses précieux conseils, cette thèse lui est dédiée.

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Biotechnologie de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne sous la direction de Monsieur TRAN MINH.

Je voudrais ici exprimer mes remerciements les plus sincères à Messieurs TRAN MINH et LANCELOT, responsables de la section Génie Industriel et Biotechnologie, qui, en m'accordant leur confiance, ont permis la réalisation et l'aboutissement de ce travail abordant des thèmes aussi variés qu'intéressants. D'autre part, ce travail a été soutenu par la société SANOFI et plus particulièrement Monsieur PIGEROL que je remercie pour le soutien matériel qu'il nous a accordé.

Je voudrais, de même, exprimer ma reconnaissance toute particulière à Monsieur le Professeur VILLARD qui a accepté d'être à la fois président du jury et rapporteur de ce travail, pour la qualité de son aide et de son soutien dès le début de ce travail. J'associerais à ces remerciements Monsieur BOURGOIS qui, avec enthousiasme et dévouement, m'a intensément aidé dans la compréhension des mécanismes chimiques mis en jeu et qui m'a beaucoup touché en acceptant d'être rapporteur de cette étude.

Que Monsieur le Professeur BRAUER trouve ici l'expression de ma gratitude pour son hospitalité et son soutien lors du stage que j'ai effectué dans son laboratoire à l'Université Technique de Berlin où j'ai pu acquérir une expérience en génie des procédés. Je souhaite à A.KLIPPE une fin de thèse à l'image de la coopération fructueuse que nous avons entreprise et des relations qui nous lient.

Je remercie Madame le Docteur FERNANDEZ de l'Institut de Fermentation de Madrid ainsi que Monsieur le Professeur COLLOMBEL de m'avoir fait l'honneur et l'amitié de juger ce travail en faisant partie du jury.

Cependant, ce travail n'aurait pu être mené à bien sans le concours de nombreuses personnes. Craignant de ne pouvoir être exhaustif, je voudrais remercier tous ceux qui ont pu m'aider. J'aimerais, néanmoins, citer Monsieur PAUTET, pour la gentillesse et la rigueur de son aide, notamment dans la synthèse des composés explicitant nos réactions.

Je n'omettrais pas Messieurs ARPIN, HUGHENEY et VALLA qui m'ont judicieusement et patiemment conseillé dans la conduite de cette thèse.

Je voudrais insister sur l'aide considérable que m'a apportée A.M. DANNA : sa disponibilité, son efficacité ainsi que sa rigueur de travail ont été le moteur de cette étude. Que M.C. BARTHOLIN trouve également ici le témoignage de mon amitié, son altruisme et sa générosité n'égayant que sa rigueur d'esprit et son efficacité.

En outre, j'adresse mes remerciements à D. CHAVANNE, H. BESSET et H. VAILLANT pour l'aide diligente qu'ils ont pu m'apporter. Je tiens aussi à remercier pour leurs compétences F. AVONDO pour les photographies, P. JOUFFREY pour la microscopie électronique ainsi que Messieurs BREUIL, DARLES et LOUBET pour la reprographie. Que Mesdames MATHAIS et ZANOLO trouvent ici l'expression de mon amitié.

Enfin, je n'oublie pas ceux qui ont été avec moi tout au long de ce travail de recherche : Laurent avec qui j'ai commencé cette thèse, François, Jean-Marie, Bernadette, Pierre, Satish, Stéphane, Isabelle, Florence, Françoise, Rémy, Helmut, Denis et Jean-Pascal. Je leur adresse tous mes vœux de réussite.

RESUME

BIOCONVERSION FONGIQUE. APPLICATION A LA PRODUCTION D'UN AGENT ANTITUMORAL : LA 9-HYDROXY ELLIPTICINE.

Le dérivé 9-hydroxylé de l'Ellipticine est un alcaloïde indolique dont la forme quaternisée a montré une activité remarquable contre certaines formes de tumeurs. La synthèse chimique du dérivé 9-substitué, à la base du Celiptium® utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse, est de faible rendement et de coût élevé. Ceci nous a conduit à la recherche d'une autre voie de production utilisant le système enzymatique du cytochrome P-450. En effet, de nombreuses substances chimiques, présentes dans l'environnement, sont métabolisées par ce système des monooxygénases qui détoxifie ainsi l'organisme. Présent dans de nombreux microorganismes et notamment au sein des champignons, ce système enzymatique recèle des potentialités tout à fait remarquables et permet de transformer l'Ellipticine en 9-hydroxy ellipticine qui peut elle-même s'oxyder et former des composés se comportant comme des agents pro-alkylants *in vivo*.

Nous avons donc développé un procédé d'oxydation enzymatique de l'Ellipticine par l'utilisation d'un système fongique tel que la souche *Aspergillus alliaceus* ou la souche *Cunninghamella echinulata*.

Nous avons ainsi déterminé les conditions optimales d'extraction des composés puis réalisé le dosage des substances témoins et des essais de bioconversion par chromatographie sur couche mince et chromatographie en phase liquide. Les problèmes rencontrés lors de ces dosages nous ont amenés à la proposition d'un mécanisme réactionnel explicitant l'oxydation du dérivé 9-hydroxylé *in vitro*. De façon à doser ces dérivés oxydés, nous avons mis au point une méthode colorimétrique.

Les résultats obtenus sur la transformation de l'Ellipticine montrent que la méthode consistant en un traitement du mycélium et un contact limité de l'Ellipticine avec le système fongique suffit pour obtenir une transformation de notre alcaloïde.

Par rapport à un procédé classique de bioconversion de l'Ellipticine décrit dans la littérature, le temps de culture nécessaire est réduit de moitié pour une production de 9-OH ellipticine doublée sur des cultures effectuées au laboratoire. Les essais réalisés sur un fermenteur "pulsé" d'un nouveau type tendant à augmenter les transferts de matières démontrent que l'exploitation du mécanisme de cisaillement mis en jeu dans ce type de réacteur permet d'accroître les rendements de biomasse fongique. De même, les taux de conversion obtenus montrent que la durée de culture est divisée par 4 pour une production de 9-OH ellipticine triplée.

Afin de déterminer une possible oxydation chimique biomimétique de l'Ellipticine, nous avons réalisé de nombreux essais à l'aide de divers systèmes oxydants. Seul, le sel de Fremy conduit à la formation de 9-oxo ellipticine. L'oxydation de l'Ellipticine en position 9 semble donc se faire de façon plus spécifique et dans des conditions plus douces au sein d'un système fongique.

L'étude d'une préfaisabilité industrielle de la transformation fongique de l'Ellipticine montre la possibilité effective de recourir à ce moyen de production.

La bioconversion de l'Ellipticine en un dérivé 9-hydroxylé, démontrée au laboratoire sur des cultures et appliquée dans un réacteur pulsé, est donc susceptible de remplacer la synthèse chimique.

ZUSAMMENFASSUNG

<p>PILZUMWANDLUNG ANWENDUNG ZUR PRODUKTION EINES ANTIKREBSMITTELS : DAS 9-HYDROXYD ELLIPTICIN</p>

Das 9-Hydroxydderivat des Ellipticins ist ein Indolalkaloid, dessen quartäre Form eine deutliche Wirkung auf verschiedene Tumorarten gezeigt hat. Dieses Hydroxydderivat, das als Ausgangsstoff zur Produktion des Celiptiums® dient, wurde bereits zur chemischen Behandlung von Krebsgeschwüren angewendet. Jedoch ist die chemische Synthese des 9-Hydroxydderivates sehr kostspielig und die Produktionsrate unzureichend. Deshalb haben wir ein anderes Produktionsverfahren verfolgt, indem wir eine enzymatische Umwandlung mit Hilfe des Cytochromes P-450 entwickelt haben.

Zahlreiche in der Natur vorkommende chemische Substanzen sind über den Vorgang der Monooxygenase metabolisiert worden. Dieser Vorgang führt zu einer Entgiftung des Organismus. Durch die Anwesenheit in zahlreichen Mikroorganismen und besonders im Pilz bietet dieses enzymatische System eine absolut wirksame Möglichkeit der Umwandlung vom Ellipticin zum 9-Hydroxyd Ellipticin. Dieses oxidiert sich selbst und bildet Derivate, welche sich wie pro-alkyle Wirkstoffe *in vivo* verhalten.

Folglich haben wir das Ellipticin durch die Entwicklung eines enzymatischen Fermentationsprozesses mit Hilfe von Pilzkulturen oxidiert, wobei uns als Stammkultur der *Aspergillus alliaceus* oder der *Cunninghamella echinulata* diente. Nachdem wir die optimalen Abtrennungsbedingungen für die Substanzen gefunden hatten, bestimmten wir die Dosierung der Probesubstanz und untersuchten danach die biologische Umwandlung der Versuchssubstanz mittels der Dünnschichtchromatographie und der Flüssigkeitschromatographie. Aufgrund der so gewonnenen Ergebnisse, folgerten wir einen Reaktionsmechanismus, der die Oxidation des 9-Hydroxydderivates *in vitro* erklärt. Zur Quantitätsbestimmung des oxidierten Derivates wendeten wir die Kolorimetriemethode an.

Die Ergebnisse der Ellipticinumwandlung zeigen, daß die Methode des Schimmelpilzfermentationsprozesses, verbunden mit einem zeitlich limitierten Kontakt zwischen Ellipticin und Schimmelpilz, eine Umwandlung des Alkaloids gewährleisten. Im Vergleich zu der in der Literatur beschriebenen klassischen biologischen Umwandlung des Ellipticins, verringert sich die notwendige Wachstumszeit der Pilzkultur um die Hälfte. Zugleich erzielten wir den doppelten Ertrag des 9-Hydroxyd Ellipticins im Labor.

Der neu entwickelte Hubstrahlbioreaktor ermöglicht eine Steigerung des Stofftransportes. Die dadurch erzielte höhere Ausnutzung des Zellenmechanismus führt zu einer

Steigerung der Biomassenproduktion. Gleichfalls erzielten wir die dreifache Produktion des 9-OH Ellipticins bei einer um das vierfache verringerten Fermentationszeit.

Um eine mögliche reproduzierbare chemische Oxidation des Ellipticins nachweisen zu können, haben wir mit Hilfe verschiedener Oxidationssysteme zahlreiche Versuche durchgeführt. Lediglich die Methode mit "Sel de Fremy" führte zu einer Bildung des 9-Oxo Ellipticins. Die Oxidation dieses Alkaloids in der Position 9 scheint sich stark spezifisch und langsamer im Innern des Schimmelpilzes einzustellen.

Die Untersuchungen bezüglich eines industriellen Einsatzes dieser Umwandlungsmethode durch Pilzkulturen eröffnen eine reale Möglichkeit diese mittels eines Produktionsverfahrens zu nutzen. Die biologische Umwandlung des Ellipticins in ein 9-Hydroxyd Ellipticin im Labor, ermöglicht durch den Hubstrahlbioreaktor, ist also geeignet, die chemische Synthese zu ersetzen.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
--------------	---

I - L'ELLIPTICINE ET LE SYSTEME DE BIOCONVERSION

I.1 - RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE	3
I.1.1 - L'ELLIPTICINE	3
I.1.1.1 - Introduction	3
I.1.1.2 - Chimie de l'Ellipticine	4
a) Structure	4
b) Liaison à l'acide nucléique	5
I.1.1.3 - Cytotoxicité et propriétés antitumorale	6
I.1.1.4 - Mécanisme d'action et métabolisme	9
a) Action sur l'Acide désoxyribonucléique	12
b) Oxydo-réduction des dérivés de l'Ellipticine	12
c) Action sur le monooxygénases à cytochrome P-450	13
I.1.1.5 - Toxicité et propriétés pharmacologiques	17
I.1.1.6 - Essais cliniques	18
I.1.2 - SYNTHESE CHIMIQUE DE L'ELLIPTICINE	18
I.1.2.1 - Synthèse et réactivité de l'Ellipticine	18
I.1.2.2 - Schéma actuel de production	20
I.2 - SCHEMA DE CONVERSION ENVISAGE	24
I.3 - LE SYSTEME DES MONOOXYGENASES A CYTOCHROME P-450	
I.3.1 - DÉFINITION	26
I.3.2 - ACTION CATALYTIQUE DU CYTOCHROME P-450	27
I.3.2.1 - Mécanisme d'oxydation d'un substrat catalysée par le cytochrome P-450	29
I.3.2.2 - Conséquences des réactions catalysées par le cytochrome P-450	31
I.4 - LE SYSTEME DE BIOCONVERSION	
I.4.1 - LES DIFFÉRENTES SOLUTIONS POSSIBLES	32
I.4.1.1 - La voie des microsomes	32

I.4.1.2 - Les cultures cellulaires	33
a) Les cellules animales	33
b) les cellules végétales	34
I.4.1.3 - La voie microbienne	34
I.4.1.4 - Les systèmes immobilisés	37
I.4.2 - CHOIX DE NOTRE SYSTEME DE BIOTRANSFORMATION	38

II - METHODOLOGIE DE LA TRANSFORMATION

II.1 - PROBLEMATIQUE POSEE PAR NOTRE CHOIX	41
II.2 - SOUCHES FONGIQUES UTILISEES	42
II.2.1 - CARACTERES FONDAMENTAUX DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX	
II.2.1.1 - Généralités	42
II.2.1.2 - Morphologie	43
II.2.1.3 - Croissance et reproduction	43
II.2.1.4 - Classification	45
II.2.2 - LA SOUCHE <i>ASPERGILLUS ALLIACEUS</i>	45
II.2.2.1 - Classification	45
II.2.2.2 - Morphologie	47
II.2.3 - LA SOUCHE <i>CUNNINGHAMELLA ECHINULATA</i>	48
II.2.3.1 - Classification	48
II.2.3.2 - Morphologie	48
II.3 - CULTURE DES CHAMPIGNONS	55
II.3.1 - CROISSANCE FONGIQUE	55
II.3.1.1 - Croissance non limitée : définition et valeur de μ	55
II.3.1.2 - Consommation du substrat - rendement et maintenance	56
II.3.1.3.- Culture en "batch"	57
II.3.1.4 - Limitation cinétique de la croissance	60
II.3.1.4.1 - Problème général et mécanismes de base du transfert de masse	61
II.3.1.4.2 - Diffusion moléculaire	61
II.3.1.4.3 - Transferts gazeux	63
a) Rôles de l'oxygène	63
b) Modalités du transfert d'oxygène	64
c) Transfert de l'oxygène	65
II.3.2 - PRODUCTION DE BIOMASSE	65
II.3.2.1 - Différents types de culture	65

II.3.2.2.- Les rendements : valeurs et variations	66
II.3.2.3 - Forme des cultures et aspects qualitatifs de la biomasse produite	66
II.3.3 - BIOCONVERSION DE L'ELLIPTICINE	67
II.3.3.1 - Rappel bibliographique	67
II.3.3.2 - Protocole expérimental	68
II.3.3.2.1 - Milieu de culture	68
II.3.3.2.2 - Essais de biotransformation	68
1°/ - Essais réalisés en erlenmeyers	68
a) Préparation des cultures	69
b) Paramètres de la croissance	69
c) Introduction de l'Ellipticine	71
d) Biotransformation de l'Ellipticine	72
2°/ - Essais effectués en fermenteur	72
a) Description du fermenteur	75
b) Mécanismes de transferts dans l'"Hubstrahlbioreaktor"	76
c) Conditions opératoires	79
 II.4 - EXTRACTION DE L'ELLIPTICINE ET DE SES DERIVES	
II.4.1 - BROyage DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX	83
II.4.1.1 - Les différents systèmes de broyage	83
II.4.1.2 - Moyens de broyage testés	83
II.4.2 - EXTRACTION DES COMPOSÉS	84
II.4.2.1 - Etude théorique succincte	84
II.4.2.2 - Méthodologie suivie	86
II.4.2.2.1 - Détermination des paramètres optimaux	86
II.4.2.2.2 - Schéma d'extraction suivi	87
 II.5 - OXYDATION BIOMIMETIQUE DE L'ELLIPTICINE	
II.5.1 - PRINCIPE	89
II.5.2 - SYSTEMES EMPLOYÉS	90

III - DOSAGE DE L'ELLIPTICINE ET DE SES DERIVES

III.1 - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES	93
III.1.1 - RAPPELS ET COMPARAISON	93
III.1.2 - LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	96
III.1.2.1 - Matériel et méthode	96
III.1.2.2 - Résultats	97
III.1.3 - LA CHROMATOGRAPHIQUE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	99
III.1.3.1 - Matériel et méthode	99
III.1.3.2 - Résultats et discussion	100
a) Gamme d'étalonnage sur produits témoins	100
b) Résultats sur les essais de bioconversion	104
 III.2 - LES DERIVES DE LA 9-HYDROXY ELLIPTICINE	105
III.2.1 - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	105
III.2.2 - OBTENTION DE DERIVES DE LA 9-HYDROXY ELLIPTICINE	105
III.2.2.1 - La 9-oxo Ellipticine	106
III.2.2.2 - Autres produits	106
III.2.3 - ETUDE DE LA REACTION DE DEGRADATION DE LA 9-OH ELLIPTICINE	
III.2.3.1 - Essai de quantification par colorimétrie	108
III.2.3.1.1 - Matériel et méthode	108
III.2.3.1.2 - Résultats	109
a) Spectre d'absorption moléculaire	109
b) Cinétique de la réaction	109
c) Vérification de la loi de Beer-Lambert	113
d) Concentration en hypochlorite de sodium	113
III.2.3.2 - Etude chromatographique	115
III.2.3.2.1 - Chromatographie sur couche mince	115
III.2.3.2.2 - Chromatographie liquide	116
III.2.3.3 - Discussion	118
III.2.4 - ESSAI DE STABILISATION DES DÉRIVÉS OXYDÉS	124
III.2.4.1 - Choix d'un réducteur	124
III.2.4.2 - Etude colorimétrique	125
III.2.4.3 - Essais sur des bioconversions	129

IV - RESULTATS ET COMPARAISONS

IV.1 - CROISSANCE FONGIQUE	132
IV.1.1 - CULTURES EN ERLLENMEYERS	132
IV.1.1.1 - Courbe de croissance d' <i>Aspergillus alliaceus</i>	132
IV.1.1.2 - Influence des paramètres physiques	137
IV.1.1.3 - Influence des paramètres chimiques	137
IV.1.1.4 - Aspect des cultures	138
IV.1.2 - EXPÉRIMENTATIONS CONDUITES EN FERMENTEUR	139
IV.1.2.1 - Fermenteur "classique"	139
IV.1.2.2. - Réacteur "pulsé"	139
IV.1.2.2.1 - Résultats avec la souche <i>Aspergillus alliaceus</i>	140
a) Influence de la concentration de glucose et de l'aération sur la croissance fongique.	140
b) Reproductibilité des expérimentations	140
IV.1.2.2.2 - Résultats avec la souche <i>Cunninghamella echinulata</i>	145
IV.1.2.2.3 - Discussion	145
a) Variation de la fréquence d'agitation	145
b) Variation de la concentration du substrat dans le milieu de culture	148
c) Influence de l'aération	149
d) Fermentations effectuées	149
e) Aspect qualitatif des fermentations	152
f) Conclusion	152
IV.2 - EXTRACTION DES SOUCHES FONGIQUES	
IV.2.1 - EXTRACTION PROBATOIRE SUR LES TÉMOINS	153
IV.2.1.1 - Calculs selon l'étude théorique	153
a) Ellipticine	154
b) 9-hydroxy ellipticine	155
IV.2.1.2 - Détermination des conditions optimales	155
IV.2.2 - ESSAIS D'EXTRACTION SUR DES BIOCONVERSIONS	159
IV.3 - BIOCONVERSION DE L'ELLIPTICINE	161
IV.3.1 - EXPRESSION DES RESULTATS	162
IV.3.2 - BIOCONVERSION SELON LA LITTERATURE	163
IV.3.2.1 - Résultats	163
IV.3.2.2 - Discussion	165
IV.3.3 - IMPORTANCE DU BROUAGE DES CHAMPIGNONS	166
IV.3.3.1 - Méthodes non mécaniques	166

a) Congélation-décongélation	166
b) Méthode enzymatique	168
IV.3.3.2 - Méthodes mécaniques	168
a) Sonication	168
b) Cisaillement par homogénéiseur-disperseur	169
c) Trituration cellulaire	170
d) Autres moyens	171
IV.3.4 - METHODE D'EXTRACTION AU SOXHLET	173
IV.3.5 - PARAMETRES LIES À LA BIOCONVERSION	175
IV.3.5.1 - Valeur optimale du pH	175
IV.3.5.2 - Quantité d'Ellipticine introduite	175
IV.3.5.3 - Cinétique de la transformation	177
IV.3.5.4 - Paramètres externes : lumière, oxygène, température	179
IV.3.5.5 - Discussion	179
IV.3.6 - PRÉCISION DES ANALYSES	181
IV.3.7 - ETUDE DE RÉDUCTEURS	181
IV.3.3 - CONCLUSION ET HYPOTHESES PROPOSEES	183
 IV.4 - OXYDATION BIOMIMETIQUE DE L'ELLIPTICINE	 187
IV.5.1 - LES DIFFERENTS SYSTEMES TESTÉS	187
IV.5.2 - CONDITIONS OPÉRATOIRES	189
IV.5.3 - CONCLUSION	189
 V - PREFAISABILITE INDUSTRIELLE	
 V.1 - PROPOSITION D'UN PROCEDE GENERAL	 191
V.1.1 - DESCRIPTION DU PROCEDE	191
V.1.2.- CHOIX ET HYPOTHESES	191
V.1.2.1- Un procédé "batch"	191
V.1.2.2- Extraction liquide-liquide	193
V.1.2.3 - Broyage et centrifugation	193
V.1.2.4 - Hypothèses de bioconversion	193
 V.2 - ETUDE DES COUTS	 194
 V.3 - CONCLUSION	 198
 CONCLUSION	 201

ABBREVIATIONS UTILISEES

Aa	Abréviation de la souche fongique <i>Aspergillus alliaceus</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
C.C.M	Chromatographie sur couche mince
Ce	Abréviation de la souche fongique <i>Cunninghamella echinulata</i>
C.L.H.P	Chromatographie liquide haute performance
Cyt. P-450	Cytochrome P-450.
DI ₅₀	Dose inhibitrice à 50%
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E, Ell., Ellipt.	Ellipticine
ϵ	Coefficient spécifique d'absorbance molaire
E.D.T.A	Acide éthylènediaminetétraacétique (sel disodique)
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FMN	Flavine Mononucléotide
Glc	Glucose
K _{app}	Constante d'association apparente
ILS	Increase of life span (augmentation de survie)
λ	Longueur d'onde
μ	Taux de croissance
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide, forme réduite
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (phosphate); forme réduite
NADP ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (phosphate); forme oxydée
NuH	Nucléophile
P	Produit (chapitre V) = 9-OH formée
pK _a = -log K _a	Constante d'acidité du couple acide-base considéré
P.V.P	Polyvinyl de Pyrrolidone (agent solubilisant)
Rdt	Rendement
R _f	"Race factor" : c'est le rapport caractérisant la migration d'un soluté en C.C.M
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
TMS	Tétraméthylsilane (standard interne RMN)
t _R	Temps de rétention d'un soluté en C.L.H.P
Tris	Tampon Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
U.V	Ultra-violets

Composés chimiques :

2-CH ₃ ,9-OH ellipticinium (Celiptium®)	2 -méthyl, 9-hydroxy ellipticinium.
7-OH ellipticine	7-hydroxy ellipticine
8-OH ellipticine	8-hydroxy ellipticine
9-NH ₂ ellipticine	9-amino ellipticine.
9=O ellipticine	9-oxo ellipticine (forme quinone-imine)
9=O,10-OCH ₃ ellipticine	9-oxo,10-méthoxy ellipticine
9=O,10,10-di-OCH ₃ ellipticine	9-oxo,10 di-méthoxy ellipticine
9-OCH ₃ ellipticine	9-méthoxy ellipticine
9-OH ellipticine ; 9-OH E	9-hydroxy ellipticine
9-OH,10-OCH ₃ ellipticine	9-hydroxy, 10-méthoxy ellipticine

Légendes des schémas du chapitre IV :

$$\text{Rdt global} = \frac{\text{Tous les produits détectés}}{\text{quantité d'Ellipticine introduite}} \times 100$$

$$\text{Ellipt. résid.} = \frac{\text{Ellipticine retrouvée}}{\text{quantité d'Ellipticine introduite}} \times 100$$

$$\text{Dérivés prod.} = \text{Quantité de 9-OH ellipticine et de ses dérivés oxydés formés} \\ \text{exprimée en mg.g}^{-1} \text{ de matière sèche}$$

$$\text{9-OH prod.} = \text{Quantité de 9-OH ellipticine uniquement formée} \\ \text{exprimée en mg.g}^{-1} \text{ de matière sèche}$$

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies cancéreuses représentent aujourd'hui un mal devant lequel nous sommes pas ou peu armés. La chimiothérapie reste, sans conteste, la seule arme efficace pour détruire les cellules tumorales qui échappent à la chirurgie et à la radiothérapie.

Mais les composés anticancéreux doivent posséder deux propriétés apparemment inconciliables : ils doivent être à la fois cytotoxiques et sélectifs. Ils doivent donc exterminer les cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules normales, ce qui exige de ces substances une "subtilité" que seule leur confère une certaine complexité. Complexité que les chimistes doivent chercher auprès de molécules d'origine naturelle.

Ainsi, organismes de recherche et industries pharmaceutiques se sont lancés dans une course d'isolement et de fabrication de substances anticancéreuses. En 1984, il n'existait que 32 produits anticancéreux commercialisés aux Etats-Unis [1] et ces composés font l'objet d'études permanentes. Les chercheurs tentent de découvrir parmi les produits naturels issus de plantes, d'invertébrés marins, d'algues ou de microorganismes, de nouvelles molécules dotées de telles capacités antitumorales.

L'Ellipticine fait partie de ces molécules découvertes à partir d'extraits de plantes et dont certains dérivés possèdent des propriétés antitumorales tout à fait intéressantes.

Le dérivé 9-hydroxylé de l'Ellipticine, dérivé prometteur très efficace contre certaines formes de tumeurs, apparaissait ainsi comme une molécule d'avenir par formation de dérivés quaternisés pour leur solubilisation [2 - 4].

Les industries pharmaceutiques ont alors tenté la production de ce composé par synthèse chimique. Mais les rendements sont faibles et les coûts apparaissent élevés. Aussi une étude a-t-elle été entreprise afin de savoir s'il était possible de trouver une autre méthode de production de la 9-hydroxy ellipticine.

L'idée de base est d'utiliser un système permettant l'oxydation enzymatique de l'Ellipticine. En effet, la plupart des substances chimiques sont hydrophobes. Lorsqu'elles sont administrées à un organisme, ces substances sont métabolisées au niveau du foie par des monooxygénases associées au NADPH et au cytochrome P-450 de façon à pouvoir les éliminer. Il s'agit donc d'un mécanisme de détoxification très efficace présent dans tout organisme procaryotique mais surtout eucaryotique et certains auteurs ont essayé de l'utiliser au sein de divers systèmes comme par exemple l'immobilisation sur gel de microsomes, de microorganismes, ou par culture de cellules hépatiques [5].

Notre travail va consister d'abord à déterminer un système de transformation enzymatique de l'Ellipticine en 9-hydroxy ellipticine, puis à développer un procédé général permettant la production de cette molécule. Cette étude inclut cependant une contrainte importante car elle doit se situer toute entière dans un but d'industrialisation. Notre souci permanent est, par conséquent, de réduire ou de simplifier au maximum les étapes nécessaires à l'élaboration de notre produit. Ce travail implique, aussi, plusieurs objectifs nécessaires à la réalisation complète de la biotransformation:

- l'étude au laboratoire du système enzymatique de conversion de l'Ellipticine;
- la récupération et le dosage de la substance recherchée;
- la préparation de réacteurs pilotes de façon à définir une faisabilité industrielle.

Néanmoins, à côté de cette étude d'oxydation enzymatique de l'Ellipticine, nous avons voulu savoir s'il était possible de trouver un système biomimétique reproduisant les monooxygénases à cytochrome P-450. Nous avons donc tenté la reconstitution d'un système chimique *in vitro* ayant des propriétés d'oxydation et permettant la synthèse de l'hydroxy-9 ellipticine à partir de l'Ellipticine.

CHAPITRE I

L'ELLIPTICINE ET LE SYSTEME DE BIOCONVERSION

FINALISTS

THESE TWO BOOKS ARE THE ONLY ones in the field that have been selected by the American Library Association as one of the best of the year. The first is a collection of essays by leading scholars in the field, and the second is a collection of essays by leading scholars in the field.

I - L'ELLIPTICINE ET LE SYSTEME DE BIOCONVERSION

La dénomination d'alcaloïdes est aujourd'hui limitée aux substances azotées complexes d'origine végétale dont la molécule renferme au moins un atome d'azote salifiable. Pour la plupart, ils sont doués, à faible dose, de remarquables propriétés pharmacodynamiques et ont une forte activité physiologique. Ces composés, à caractère basique plus ou moins prononcé, possèdent un ensemble de réactions vis-à-vis de certains réactifs chimiques.

Il n'existe pas de classification spécifique des alcaloïdes. On suit celle de la chimie organique en tenant compte d'abord de la position de l'azote qui peut être extracyclique ou compris dans le cycle.

L'Ellipticine est définie comme un alcaloïde indolique [6].

I.1 - RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.1 - L'ELLIPTICINE

I.1.1.1 - Introduction

L'Ellipticine a été extraite pour la première fois en 1959 d'*Ochrosia elliptica* Labill. (famille des Apocynaceae) qui est une espèce de petit arbuste tropical persistant [7]. Cet alcaloïde a ensuite été trouvé chez différentes espèces de plantes tropicales : *Aspidosperma*, *Excavatia* et *Bleekeria* [6].

En recherchant des substances à activité antitumorale chez des plantes australiennes, Dalton et al. [8] découvrirent en 1967 les propriétés anticancéreuses naturelles de l'Ellipticine et de la 9-méthoxy ellipticine contre quelques tumeurs murines. Ceci fut confirmé par de nombreux chercheurs, notamment aux Etats-Unis [9], complété par des études d'évaluations toxicologiques chez l'animal qui ont révélé des effets secondaires toxiques tels que des problèmes cardio-vasculaires, des hémolyses [10] et une toxicité nerveuse, notamment au niveau du cervelet [11].

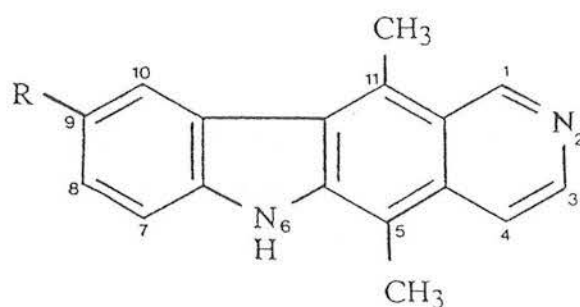
En 1970, Mathé et al. [12] rapportent l'activité antitumorale de la 9-OCH₃ ellipticine, dérivé naturel de l'Ellipticine, sur la leucémie myéloblastique aiguë chez l'homme [13]. On a pu ensuite comprendre le mécanisme d'action de cet antitumoral en relation avec sa structure : les propriétés intercalantes de la 9-OCH₃ ellipticine sur l'acide désoxyribonucléique furent démontrées [14]. L'hypothèse avancée était que ces substances avaient pour cible l'ADN [15].

La structure relativement simple de ces substances dérivant d'un noyau pyrido-carbazole a incité les chimistes à tenter des synthèses pour les fabriquer [9,16]. Ainsi, la recherche de nouveaux dérivés ayant une très forte affinité pour l'ADN conduisit à la synthèse de l'hydroxy-9 ellipticine [2,3,17] et du 2-méthyl,9-hydroxy ellipticinium [11] qui ont montré des propriétés antitumorales contre plusieurs tumeurs expérimentales. Des essais cliniques ont ensuite été publiés concernant le 2-CH₃,9-OH ellipticinium [18], qui a montré par la suite une action thérapeutique importante contre le cancer du sein [19].

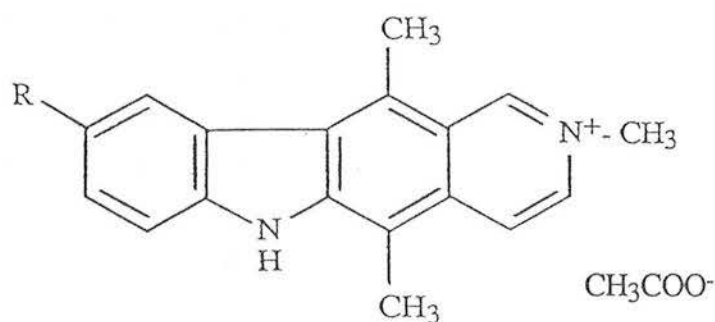
I.1.1.2 - Chimie de l'Ellipticine et de ses dérivés

a) Structure

L'Ellipticine est une molécule aromatique à quatre cycles contenant deux hétérocycles azotés et portant deux groupements méthyl. La Figure I.1 montre la structure de ce 5,11,diméthyl,6H-pyrido[4,3-b]carbazole.



R = H : Ellipticine
R = OH : 9-OH ellipticine



R = H : Acétométhylate
d'ellipticinium
R = OH : 9-OH ellipticinium
(Acétate d'elliptinium)

FIGURE I.1 : STRUCTURE DE L'ELLIPTICINE ET DE SON DERIVE 9-HYDROXYLE.

La molécule tend à devenir protonée sur la position azotée 2. Le pKa est égal à 6,8 [2]. La charge positive résultante est délocalisée sur le système cyclique entre les deux atomes d'azote.

A propos des valeurs de pKa observées, il est intéressant de noter les remarques de Kohn et al. [20] : les valeurs anormales de pKa supérieures à 9 rapportées originellement pour l'Ellipticine, la 9-amino ellipticine et la 9-hydroxy ellipticine (9-OH ellipticine) [2] ont été redéterminées à très faible concentration et ont donné les résultats suivants :

pKa = 6,8	pour l'Ellipticine
pKa = 4,9	pour la 9-NH ₂ ellipticine
pKa = 6,6	pour la 9-OH ellipticine.

La taille et la forme de la molécule d'Ellipticine la font ressembler à une paire de bases complémentaires purine-pyrimidine, géométrie favorable à l'intercalation entre les paires de bases de l'ADN [21].

La structure de l'Ellipticine est aussi remarquable car son système polycyclique aromatique ne porte aucune chaîne aliphatique liée, rendant cette molécule non sensible aux réactions d'oxydo-réduction dans des conditions douces [20].

A pH physiologique, l'Ellipticine existe à la fois sous forme non protonée et protonée : la forme non protonée a une solubilité dans l'eau extrêmement faible [22], donc une forte solubilité dans les lipides. Au contraire, une forme protonée comme la structure quaternisée polaire de l'Ellipticinium a une forte solubilité aqueuse.

Il est à noter que la capacité d'association de la 9-OH ellipticine à une autre molécule identique, est favorisée par un accroissement de la concentration de sels dans le milieu qui tendent à neutraliser la répulsion entre les charges positives de la molécule [20].

b) Liaison à l'acide nucléique

La meilleure explication de la plupart des effets biologiques de la série des Ellipticines est leurs liaisons intercalantes avec certaines parties de la double-hélice d'ADN ou d'ARN. La liaison de l'Ellipticine à l'ADN est accompagnée par des changements dans les spectres d'absorption électronique : l'Ellipticine libre à pH = 7,0 a un spectre complexe qui devient altéré lorsque l'on rajoute l'ADN. Le pic d'absorption est déplacé à une longueur d'onde plus haute (bathochromisme) tandis que l'amplitude du pic est réduite (hypochromisme). A pH = 4,7, ce spectre a un pic simple à $\lambda = 301$ nm qui peut correspondre à la forme protonée. En revanche, il n'y a plus de différences entre les spectres d'absorption de l'Ellipticine liée à l'ADN à pH = 4,7 ou à pH = 7,0. Cela signifie que la dissociation acide-base de l'Ellipticine liée à l'ADN est supprimée [20].

La constante d'association de l'Ellipticine avec de l'ADN natif est remarquablement élevée, aussi grande que celle de l'actinomycine, antibiotique connu. La constante apparente d'association de l'Ellipticine avec de l'ADN de thymus de veau pour un taux de liaison d'une molécule d'Ellipticine pour 20 nucléotides ($\text{pH} = 7,0$; $0,1\text{M Na}^+$ et à 25°C) a été estimée, selon l'auteur, à $K_{\text{app}} = 10^7$ pour l'ADN natif et $0,4.10^7$ pour l'ADN dénaturé [20]. D'autres auteurs mentionnent des K_{app} différents dans des conditions opératoires légèrement différentes ($\text{pH} = 7,4$; $0,1\text{M NaCl}$; $0,1\text{M}$ tampon Tris-HCl) : $K_{\text{app}} = 1,5.10^5$ pour l'Ellipticine et $2,0.10^6$ pour la 9-OH ellipticine [2,11]. Dans le cadre de cette étude, nous n'avons pas approfondi l'aspect chimique de l'interaction ADN-Ellipticine.

Le point intéressant est que l'Ellipticine et l'actinomycine ont des affinités d'interactions comparables au niveau de l'ADN mais des cinétiques de liaisons différentes qui peuvent expliquer leurs différences d'action [20].

I.1.1.3 - Cytotoxicité et propriétés antitumorales

L'Ellipticine et quelques-uns de ses nombreux dérivés sont actifs sur une large gamme de tumeurs expérimentales. Le Tableau I.1 résume les tumeurs formant le panel du National Cancer Institute aux Etats-Unis qui coordonne dans le monde nombre de recherches sur les molécules anticancéreuses [1].

Le Tableau I.2 décrit l'activité des deux composés les plus actifs de l'Ellipticine, la 9-OH ellipticine et le 2- CH_3 ,9-OH ellipticinium, sur quelques tumeurs murines expérimentales [11].

En général, les cellules L1210 servent à l'étude des propriétés antitumorales des substances faisant partie de la série des Ellipticines. En effet, ces cellules vivantes provoquent une leucémie mortelle quand elles sont injectées à une souris. Elles gardent leur pouvoir cancérigène quand elles sont cultivées *in vitro* dans un milieu contenant du 2-mercaptoéthanol (60nM.ml^{-1}) comme facteur de croissance [23].

Les études *in vitro* sur ces cellules L1210 ont montré que l'effet cytotoxique des composés anticancéreux analysés était rapide et provoquait un réarrangement de l'architecture cellulaire qui se traduit par l'apparition de cellules géantes. La perturbation de l'organisation et des fonctions membranaires a été démontrée [24].

La synthèse de l'ADN est préférentiellement inhibée alors que la synthèse des protéines ne semble pas affectée. Une étude faite par Alazard et al.[25] a établi que l'effet prononcé et immédiat de la 9-OH ellipticine sur la croissance et la viabilité d'une souche bactérienne comme *Escherichia coli* est dépendant de la drogue et de la concentration extracellulaire en ions magnésium.

Tumeur	Code	Origine de la tumeur	Description Histologique
TUMEURS MURINES			
Leucémie	P388	Chimiquement induite par le méthylcholanthrène	Leucémie lymphoïde
Mélanome	B16	Spontanée, à la base des oreilles	Mélanome
Cancer	CD8	Spontanée	Adenocarcinome mammaire —> métastases
Colon	Co38	Induite par le carcinogène chimique : 1,2 diméthylhydrazine	Adenocarcinome du colon —> métastases
Leucémie	L1210	Chimiquement induite par le méthylcholanthrène	Leucémie lymphoïde
Sarcome	M5	Spontanée dans les ovaires	Sarcome ascitique
XENOGRFFE DE TUMEUR HUMAINE CHEZ LA SOURIS NUDE			
Cancer	Mx-1	Cancer humain	Conduit d'infiltration de cellules du carcinome

TABLEAU I.1 : CARACTERISTIQUES DES TUMEURS DU PANEL DU N.C.I (NATIONAL CANCER INSTITUTE) [1].

La synthèse des protéines et de l'ARN est inhibée alors que la synthèse de l'ADN est seulement réduite.

SYSTEMES TUMORAUX	9-OH ELLIPTICINE	2-CH ₃ 9-OH ELLIPTICINIUM
TUMEURS MURINES		
Leucémie L1210	+	++
Leucémie P338	+	++
Carcinome du poumon de Lewis	+/-	+/-
Myélome	+	
Mélanome B16	+	+
TUMEURS DU RAT		
Lymphosarcome de Yoshida (<i>in vitro</i>)	++	
Lymphosarcome de Gardner	++	

TABLEAU I.2 : EFFETS DE LA 9-OH ELLIPTICINE ET DU 2-CH₃,9-OH ELLIPTICINIUM SUR QUELQUES TUMEURS EXPERIMENTALES [11].

Le premier effet toxique observé sur ces cellules *in vitro* est une décroissance du taux de multiplication cellulaire sans apparition de lyse cellulaire ou de mort immédiate. Les cellules sont bloquées en phase G₂ du cycle cellulaire après exposition constante des cultures pendant 24 heures par 1 µg.ml⁻¹ d'Ellipticine ou pendant 30 minutes par une dose de 10 µg.ml⁻¹ [26]. Ces cellules perdent, de plus, leur capacité à provoquer des tumeurs quand elles sont greffées sur une souris [11].

A partir du calcul de la décroissance du taux de multiplication cellulaire ou bien du pourcentage de cellules tuées, plusieurs équipes ont montré un effet manifeste et important de la 9-OH ellipticine et du dérivé 2-CH₃,9-OH ellipticinium [2,11,17,21]. Le dérivé 9-OH ellipticine apparaît le plus actif [23]. Le Peck et al.[2] ont montré que si l'Ellipticine tuait 94 % de cellules L1210 *in vitro*, son dérivé 9-hydroxylé éliminait 99,96 % des cellules. En fait, les dérivés

quaternisés sur le sommet 2 se révèlent plus efficaces tant sur les tumeurs expérimentales qu'humaines [27].

Les doses nécessaires estimées se situent entre 5 mg.kg⁻¹ pour le 2-CH₃,9-OH ellipticinium et 500 mg.kg⁻¹ ou plus pour le 9-bromo ellipticinium.[11].

Les doses nécessaires à la DI₅₀ (dose qui réduit la croissance cellulaire de 50 % après 48 heures par comparaison avec des témoins) sur les cellules étaient de 242 ng.ml⁻¹ pour l'Ellipticine, 13,8 ng.ml⁻¹ pour le 2-CH₃,9-OH ellipticinium et de 3,9 ng.ml⁻¹ pour la 9-OH ellipticine.

Un effet synergique du co-facteur NADP⁺ sur les propriétés antitumorales de faibles doses de 9-OH ellipticine sur les cellules de Walker a été constaté [28]. L'activité de ces dérivés est très proche de celle de la plupart des drogues antitumorales cytotoxiques.

Des relations structure-activité ont été mises en évidence dans la série des Ellipticines.

Le Tableau I.3 dresse une liste exhaustive des propriétés antitumorales des dérivés de l'Ellipticine en fonction des positions de substitution sur cette molécule. Ces résultats sont le fait d'une inoculation intrapéritonéale sur une souris ayant une leucémie L1210 [20].

S. Cros [1] a publié récemment un schéma intéressant concernant la relation structure-activité dans la série des diméthyl-pyrido-carbazoles sur la leucémie murine L1210. La Figure I.2 présente les résultats obtenus selon le critère d'évaluation de l'activité antitumorale basé sur la survie des animaux *in vivo*, ou des cellules *in vitro*.

1°/ On constate que l'hydroxylation en C9 permet l'obtention d'une cytotoxicité diminuée par la mesure de la DI₅₀ (Dose inhibitrice 50 %) sur des cultures cellulaires, donc *in vitro*.

2°/ La survie des animaux pour des DI₅₀ identiques à celle déterminée pour la 9-OH ellipticine est bien corrélée *in vivo*. L'auteur a calculé des doses permettant au moins un prolongement de 25 % de la survie des traités par rapport aux témoins.

I.1.1.4 - Mécanisme d'action et métabolisme

L'Ellipticine semble agir selon un mécanisme de cytotoxicité sélective vis-à-vis de certains composés (les alkylants bifonctionnels et les électrophiles étant promis à un brillant avenir). Il faut remarquer que les cellules en phase stationnaire sont moins sensibles à la plupart des agents antitumoraux que celles en phase exponentielle de croissance [21].

Position de la substitution	RESULTATS
1	La méthylation préserve l'activité. La substitution d'un groupement Br, butyl ou phényl conduit à des dérivés inactifs.
2	La méthylation préserve l'activité. Les dérivés N-oxydés sont inactifs.
3	La méthylation inactive le dérivé.
4	Aucune donnée.
5	L'élimination des deux groupements méthyl de l'Ellipticine l'inactive.
6	Une substitution introduit une charge positive. La substitution de méthyl, allyl, hydroxyéthyl préserve l'activité mais de plus importantes substitutions inactivent généralement ces dérivés.
7	Le 7,10-diméthyl ellipticine est inactif.
8	Aucune donnée.
9	De nombreux travaux ont été faits : Le Peck et al. [2] mentionne que la 9-OH ellipticine est plus active que l'Ellipticine et que le dérivé bromé est inactif. Les dérivés méthoxylés en position 9 sont aussi actifs [8].
10	Le 7,10-diméthyl ellipticine est inactif.
11	La suppression de ce groupement 11-méthylé détruirait l'activité [2]. Des tests complémentaires ont montré une rétention importante d'activité.

TABLEAU I.3 : ACTIVITE DES DERIVES DE L'ELLIPTICINE SELON LA POSITION DE LA SUBSTITUTION [20].

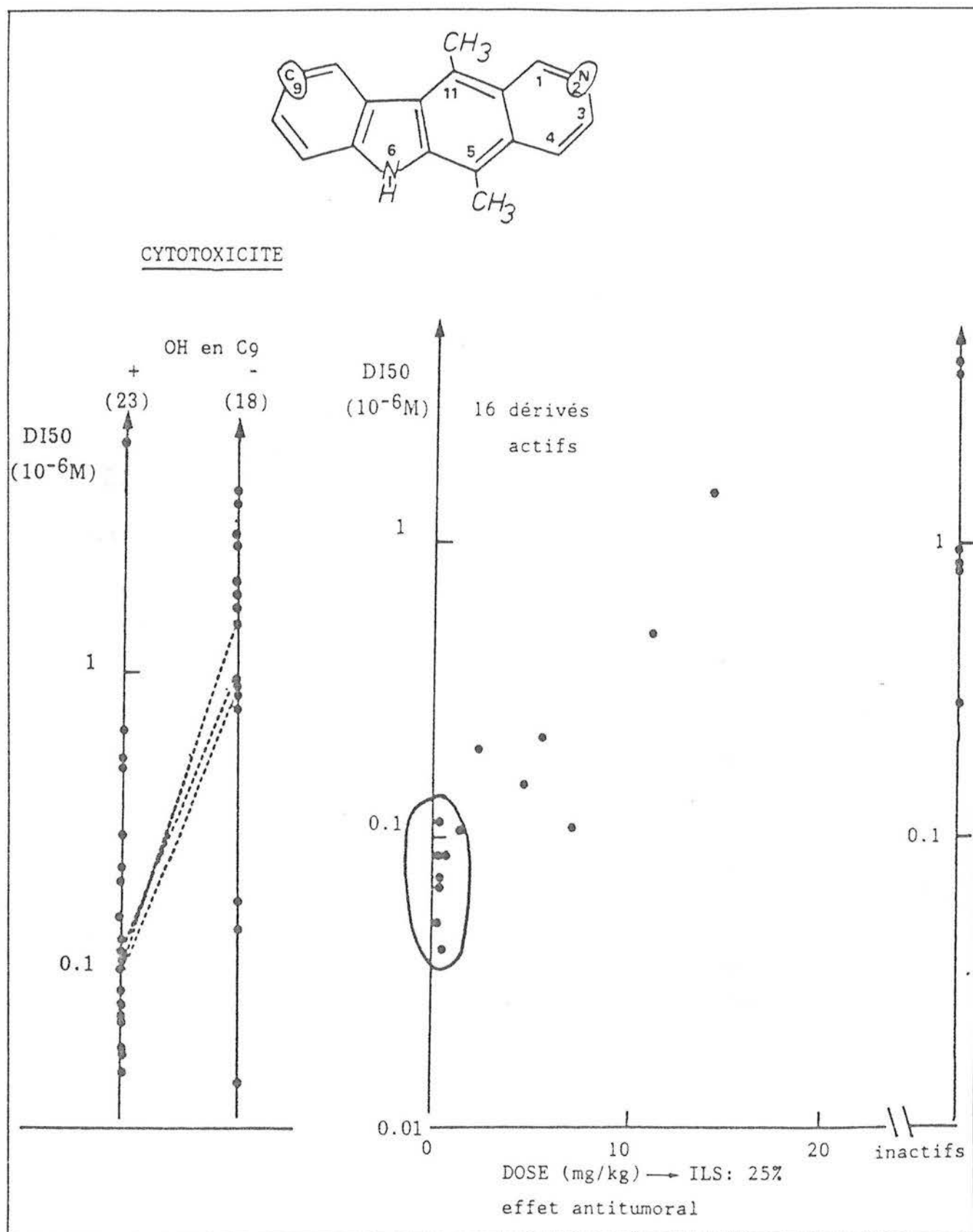


FIGURE I.2 : RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DANS LA SERIE DES DIMETHYL-PYRIDOCARBAZOLE SUR LA LEUCEMIE L 1210 [1].

a) Action sur l'acide désoxyribonucléique

Nous avons vu précédemment que l'Ellipticine et ses dérivés actifs montrent une forte affinité pour l'ADN et inhibent la synthèse de l'ADN des cellules malignes en culture sans modifier la synthèse de l'acide ribonucléique et des protéines.

Le phénomène d'induction des cassures sur l'ADN par ces composés ou par la formation de zones alcalines sensibles au sein de l'ADN a été précisé [15]. Malvy [21] a montré que la 9-OH ellipticine ne crée pas de coupures sur l'ADN mais les induit. Certains auteurs, après avoir procédé à des études sur des cellules résistantes à la 9-OH ellipticine, ont émis l'hypothèse de l'implication d'une protéine dans le mécanisme d'action des Ellipticines [29]. Récemment, Multon et al. [19] ont approfondi les dernières connaissances sur ce mécanisme de cassure de l'ADN par les Ellipticines ainsi que d'autres agents intercalants : il y a interaction entre le composé intercalant et la topoisomérase II, enzyme des mammifères qui altère la conformation de l'ADN.

La résistance cellulaire aux dérivés de l'Ellipticine peut donc être la conséquence d'une modification qualitative ou quantitative de cette enzyme [29].

Parmi tous les dérivés de l'Ellipticine, ceux qui induisent le plus grand nombre de coupures sur l'acide désoxyribonucléique ne sont pas les plus antitumoraux sur les tumeurs expérimentales [21].

L'Ellipticine et ses dérivés sont également mutagènes aussi bien pour les procaryotes (Salmonelles) [30,31], que pour les eucaryotes [11]. La capacité de ces substances à être mutagènes pour les microorganismes a entraîné la mise au point de méthodes permettant la détection de substances cancérogènes mutagènes (le test de Ames est un test très connu [32]). Une autre méthode utilisée pour la recherche de cultures de champignons de la classe des Actinomycètes a été mise au point [33].

Néanmoins, la 9-OH ellipticine peut inhiber les mutations induites par de nombreux produits en exerçant un effet protecteur [34]. Les dérivés 9-substitués sont de bons inhibiteurs de mutations induites particulièrement par le méthyl-3 cholanthrène [35].

b) Oxydo-réduction des dérivés de l'Ellipticine

Si la forte affinité des Ellipticines pour l'ADN semble être requise pour l'expression d'un effet antitumoral, cela ne constitue cependant pas une condition suffisante.

Ainsi, la 9-amino ellipticine et la 9-fluoro ellipticine ont des affinités pratiquement identiques à celles de la 9-OH ellipticine et du 2-CH₃,9-OH ellipticinium mais n'ont pas des propriétés antitumorales comparables à ces derniers.

On peut remarquer que l'oxydation de l'Ellipticine en position 9 conduit à un composé 40 fois plus actif que l'Ellipticine elle-même [11].

Deux hypothèses ont été développées. La première considère que l'accroissement de l'affinité pour l'ADN est dû à l'hydroxylation en position 9. La seconde hypothèse est fondée sur les propriétés d'oxydo-réduction des dérivés 9-hydroxylés de l'Ellipticine. Ces composés peuvent être oxydés en dérivés quinone-imine avec départ de deux ions d'hydrogène [11,31,36]. Une étape intermédiaire dans ce système peut survenir avec le départ d'un seul ion d'hydrogène et peut conduire à un radical "phenoxy-like" [31]. Si de telles réactions se produisent *in vivo*, des radicaux toxiques sont formés et causent des dommages irréversibles sur l'ADN.

Cette hypothèse a été favorisée par une observation : l'oxydation de la 9-OH ellipticine par des peroxydases qui la transforme en dérivé quinone-imine. L'efficacité de cette 9-OH ellipticine est donc le fait de deux propriétés : une très forte affinité pour l'ADN et l'aptitude à générer des formes radicalaires transitoires qui peuvent constituer des réactifs cytotoxiques [11].

L'interaction de ces dérivés hydroxylés sur la cible finale d'ADN a avivé de nombreuses recherches avec la connaissance du mécanisme d'action qui pouvait être comparé à d'autres composés antitumoraux possédant une quinone-imine : mitomycine C, anthracyclines par exemple.

La bioréduction de ces substances conduit à des intermédiaires réactifs instables (réduction de la fonction hydroxyle) pouvant être responsables de leur activité cytotoxique. De nombreux auteurs se sont penchés sur ce phénomène [11,31,36-41]. Les articles parus tendent à définir ces molécules comme des agents pro-alkylants *in vivo* [42].

Bien que dans la littérature certains auteurs considèrent ces composés assez stables pour être préparés, il n'en reste pas moins vrai que ces phénomènes d'oxydo-réduction restent problématiques. Ils impliquent probablement, d'une part, des effets importants *in vivo* et doivent déclencher, d'autre part, une cascade de réaction *in vitro* selon les milieux de solution et les réactifs employés. Nous aurons d'ailleurs l'occasion de revenir largement sur ce point épineux.

Meunier et al. [41] ont proposé très récemment un schéma d'hypothèses explicitant ces mécanismes possibles d'oxydation mentionnés sur la Figure I.3.

c) Action sur les monooxygénases à cytochrome P-450

Après injection intraveineuse, l'Ellipticine est rapidement oxydée dans le foie par le système des monooxygénases à cytochrome P-450 qui intervient dans le métabolisme de drogues anticancéreuses variées [5,43,44].

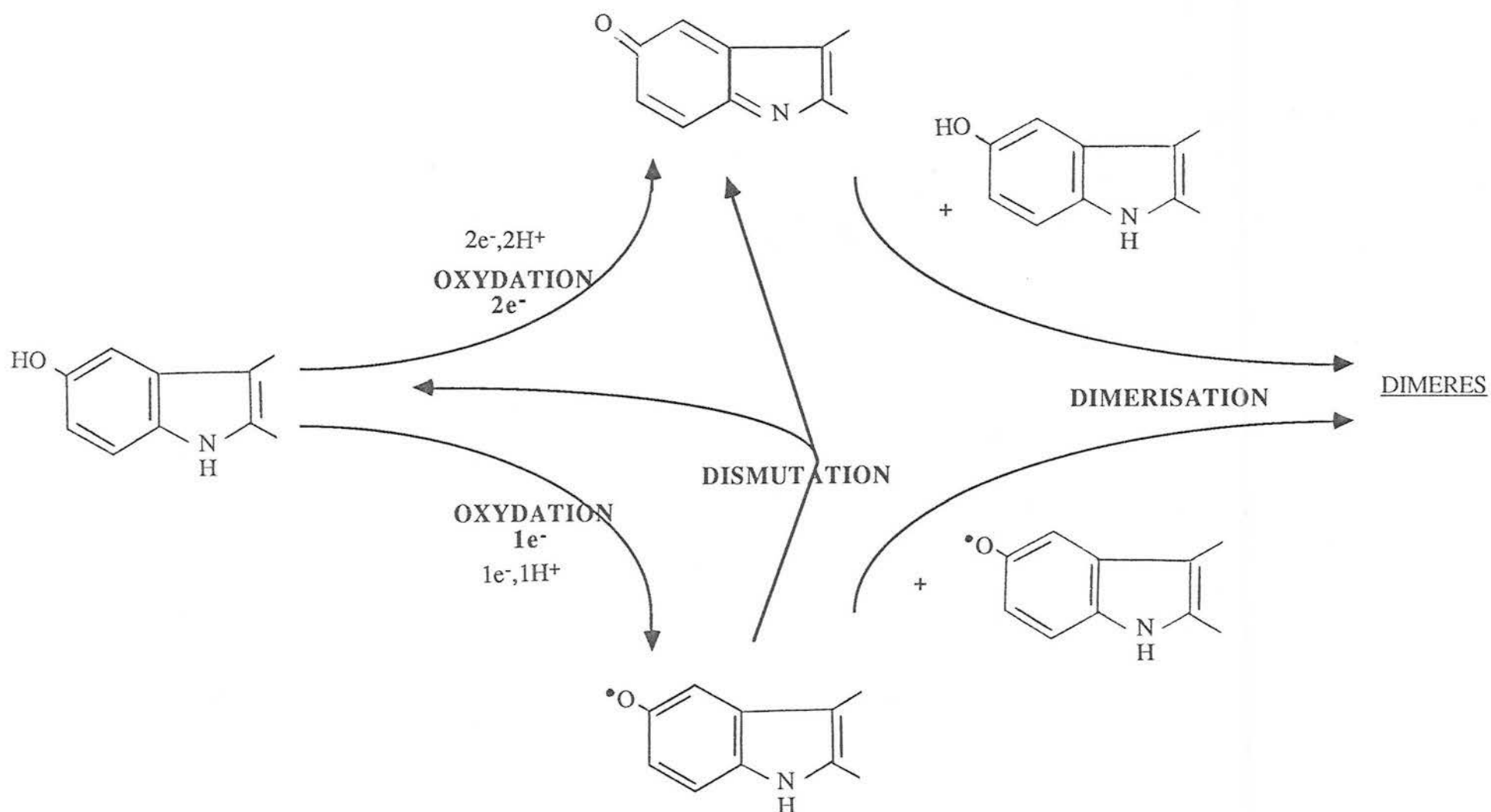


FIGURE I.3 : VOIES POSSIBLES D'OXYDATION (1 et 2 e^-) DES ELLIPTICINES HYDROXYLEES [41].

L'oxydation de l'Ellipticine intervient après liaison de la drogue au site actif des monooxygénases. L'affinité de l'Ellipticine et de ses dérivés pour le cytochrome P-450 a été montrée par de nombreuses études [34,45]. L'Ellipticine et ses dérivés 9-substitués notamment produisent, quand ils sont ajoutés à une suspension de microsomes oxydés, l'émergence d'un pic en U.V. à 420 nm. Ceci révèle une liaison avec le site catalytique du cytochrome P-450 par interaction de l'atome d'azote pyridinique des Ellipticines avec le fer^{III}. La substitution en position 1 et la quaternisation entraînent une perte totale de l'affinité [31].

L'induction des monooxygénases hépatiques par l'Ellipticine chez le rat a été démontrée par la formation de cytochrome P-448 à activité hydroxylante [46]. L'influence des inducteurs de ce système enzymatique n'est pas sans conséquence sur l'efficacité cytotoxique de l'Ellipticine sur les cellules leucémiques L 1210 [47].

Si l'Ellipticine peut induire la formation de cytochrome P-448 chez le rat, cette induction se rapprocherait de celle qui est caractéristique de certains polyaromatiques comme le méthyl-3 cholanthrène.

L'interaction des dérivés de l'Ellipticine avec les microsomes a déjà été étudiée *in vitro* [45]. L'Ellipticine est hydroxylée principalement en position 9 par les microsomes de foie de rat en présence de NADPH *in vitro* [31].

Ces composés peuvent également inhiber les monooxygénases microsomales qui sont la voie de biotransformation de ces substances [27,35]. Cette interaction négative sur le cytochrome P-450 se ferait selon des mécanismes d'inhibition compétitive ou non-compétitive déterminés par l'inducteur [48].

Les composés quaternisés ne se lient pas au cytochrome P-450 [11,31]. Des préparations de microsomes de foie de rat induits par du phénobarbital *in vitro* sont, en revanche, capables d'hydroxyler l'Ellipticine avec un rendement de 10 à 15%. Au cours de cette réaction, la 9-OH ellipticine est formée ainsi que de la 7-OH ellipticine mais en petite proportion (moins de 10%) [49,50]. *In vivo*, l'Ellipticine est aussi métabolisée. Les deux métabolites majeurs sont les glucuro-conjugués et les sulfo-conjugués de la 9-OH ellipticine [50].

Le 2-CH₃,9-OH ellipticinium n'est pas métabolisé et est excrété dans la bile (75%) et les urines (25%) [31].

La destinée métabolique des divers dérivés de l'Ellipticine peut cependant être très variable et doit être importante dans la détermination de l'activité pharmacologique de ces composés. La cytotoxicité de l'Ellipticine reste fortement affectée par son métabolisme. Paoletti et al.[31] ont défini un schéma précisant ce métabolisme qui est reporté sur la Figure I.4.

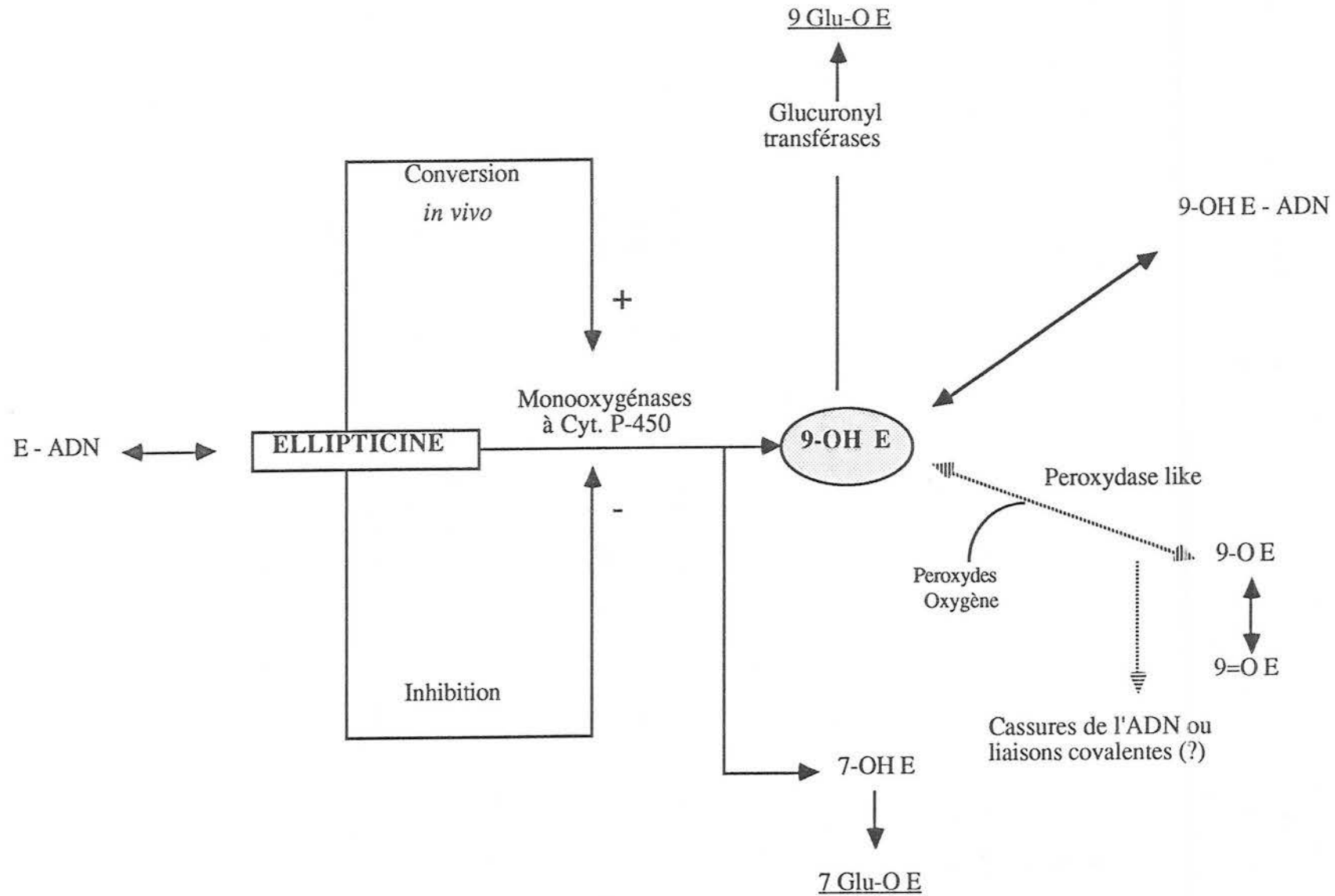


FIGURE I.4 : SCHEMA DU METABOLISME DE L'ELLIPTICINE SELON PAOLETTI ET AL.[31].

I.1.1.5 - Toxicité et propriétés pharmacologiques

La toxicité des dérivés de l'Ellipticine dépend de leur nature. On n'observe pas d'effet toxique sur l'embryon ni d'effet tératogène chez la souris avec le 2-CH₃,9-OH ellipticinium [11]. Il n'y a pas non plus d'effet sur les cellules hématopoïétiques. Ce dérivé est en général bien supporté lors d'administration chronique.

Cette innocuité hématologique et hépatique contraste fortement avec les effets sévères induits par la plupart des agents anticancéreux sur l'hématopoïèse [4].

L'Ellipticine est capable d'hémolyser *in vivo* et *in vitro* le sang. Cette hémolyse est bloquée par administration simultanée d'acide citrique. La 9-OCH₃ ellipticine n'induit pas ce phénomène d'hémolyse [10].

On retrouve au niveau de la toxicité, l'action mutagène de l'Ellipticine précédemment décrite sur les procaryotes et les eucaryotes.

La 9-OH ellipticine provoque chez la souris une hypothermie, des désordres hématologiques affectant les leucocytes et des désordres neurologiques [51]. L'action cardiovasculaire de l'Ellipticine a aussi été notée : hypotension sanguine, bradycardie. Tous ces effets sont réversibles [11,51]. Même si des troubles respiratoires apparaissent, l'hydroxylation en position 9 de l'Ellipticine aurait un effet cardio-stimulant [51]. On constate aussi que l'action antiinflammatoire de ce même composé a toujours été observée [11,51].

Si les propriétés pharmacologiques de la 9-OH ellipticine dépendent de sa destinée métabolique, il apparaît que celles du 2-CH₃,9-OH ellipticinium sont en général beaucoup plus favorables pour l'organisme traité. Cette efficacité pharmacologique a focalisé tous les efforts sur ce composé [4,11,18]. On peut cependant noter quelques aspects néfastes de ce produit. La description récente de l'interaction de l'Ellipticinium avec les récepteurs muscariniques en est un exemple [52]. Cela pourrait expliquer certains effets secondaires désagréables chez les patients soumis à un traitement comportant ce dérivé quaternisé : asialie, diarrhée.

Ce 2-CH₃,9-OH ellipticinium remporte donc un succès certain dans le traitement de certaines tumeurs expérimentales et humaines. D'après une étude, les variations du potentiel membranaire des cellules soumises à cet antitumoral pourraient influencer et expliquer ses propriétés pharmacologiques [53]. Des essais faits sur des cellules L 1210 vont dans ce sens.

I.1.1.6 - Essais cliniques

Les premiers essais cliniques ont été réalisés par Mathé et al. [12] avec la 9-OCH₃ ellipticine. Ils ont constaté des cas de rémissions sur des malades atteints de leucémies myéloblastiques aiguës. Des essais tentés avec la 9-OH ellipticine ont démontré son inefficacité : cela était peut-être dû à la très faible solubilité de ce composé par la voie d'introduction choisie : injection par voie intra-veineuse [11].

La quaternisation des dérivés 9-substitués élimine cet inconvénient. L'effet du 2-CH₃, 9-OH ellipticinium comparé à celui de la 9-OH ellipticine sur des leucémies L 1210 est accru [11].

Juret et al.[18] ont procédé aux premiers essais cliniques de phase I qui ont démontré que les très faibles effets toxiques décelés sont largement compensés par les rémissions importantes obtenues sur des cancers humains comme celui du sein [4,18].

Les études se poursuivent et l'on connaît maintenant des cas de rémissions sur certains cancers traités par administration de 2-CH₃,9-OH ellipticinium : carcinomes cellulaires du rein, cancer du poumon. Cet acétate d'elliptinium (Celiptium®) est en phase II des essais cliniques [54].

Une autre substance calquée sur la précédente a récemment débuté la phase I des essais cliniques. Il s'agit du chlorure de 2-(diéthylamino-2-éthyl),9-hydroxy ellipticinium [55].

I.1.2 - SYNTHÈSE CHIMIQUE DE L'ELLIPTICINE

I.1.2.1 - Synthèse et réactivité de l'Ellipticine

L'efficacité pharmacologique particulière du 9-OH ellipticinium a conduit les chercheurs à synthétiser ce produit par voie chimique. Sans détailler cet aspect, nous allons simplement donner quelques éléments qui nous paraissent importants.

Toute une série de publications sont parues sur cette synthèse. Cranwell et Saxton [56] avaient déjà proposé un schéma de synthèse de l'Ellipticine en 1962. En 1967, l'article de Dalton et al.[8] proposait une méthode de synthèse de la 9-OCH₃ ellipticine possédant les propriétés antitumorales que l'on connaît. Cet article inaugurerait une longue liste de publications concernant la synthèse de cette famille de composés et nous n'en citerons que quelques-unes. Sainsbury et al.[43,57] puis Rivalle et al.[58] apportèrent leurs contributions. Un brevet a été déposé en 1983 (Brevet européen n° 0097070) pour un procédé de préparation de dérivés de l'Ellipticine. D'autres méthodes de synthèse de nombreux dérivés sont parues [16,59,60-65].

D'autres substances à base de 6H-pyrido-carbazoles ont également été synthétisées. Les auteurs ont ainsi obtenu des nucléosides [66,67] et des glycosides d'Ellipticine [68,69]. Des analogues tricycliques de l'Ellipticine ont été définis et peuvent constituer par là une nouvelle classe d'agents antinéoplasiques [70,71].

Mais, récemment, plusieurs articles très intéressants sont parus sur un autre aspect de ce problème : la régio-spécificité de la réaction de substitution en position 9 [72]. Les auteurs montrent que le composé 9-formyl ellipticine est réarrangé en 9-OH ellipticine par traitement au peroxyde d'hydrogène, en solution dans du méthanol, et en présence d'acide sulfurique.

Un autre point, qui nous a paru important, concerne la réactivité de la position 10 de la quinone-imine formée par oxydation de la 9-OH ellipticine ou de l'acétate d'elliptinium. En effet, il a été montré plusieurs fois que la position 10 du système hétérocyclique était le site le plus électrophile [41]. Des réactions de type Michaël ont été réalisées par addition de nucléophiles comme des alcools [73], des nucléosides [41,73] ou des amino-acides [41]. Meunier a montré par calcul d'orbitales moléculaires l'importance de ce site, la Figure I.5 présente ses conclusions.

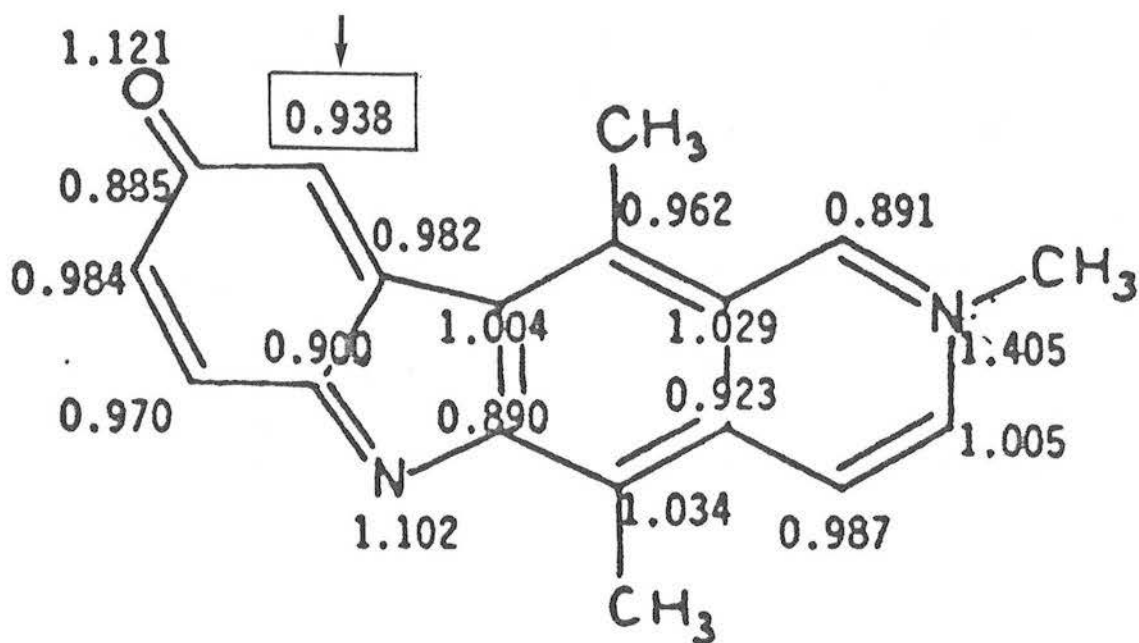


FIGURE I.5 : DENSITES ELECTRONIQUES π DU SYSTEME AROMATIQUE D'UNE QUINONE-IMINE DE L'ELLIPTICINIUM [41].

Il est manifeste que la position 10 constitue le site électrophile de la partie indolyle de la molécule. Le nucléophile ne peut pas attaquer les sites proches (iso) à cause de la présence du contre-ion acétate. On peut adapter ces conclusions à la quinone-imine formée à partir de la 9-OH ellipticine [41].

I.1.2.2 - Schéma actuel de production

Depuis l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché du 9-OH ellipticinium, la synthèse industrielle de ce composé a pris un intérêt considérable. En effet, ce produit présente un marché intéressant dans la thérapeutique anticancéreuse.

La Figure I.6 décrit l'ensemble des réactions nécessaires à la fabrication de l'acétate d'ellipticinium, commercialisé sous le nom de Celiptium®. Ce procédé passe par 18 phases en utilisant comme produit de départ le méthoxy-5 indole et appelle plusieurs remarques :

- La préparation du méthoxy-5 indole se révèle coûteuse et le rendement à partir de la para-anisidine n'est que de 55%. Lors de cette première partie de la synthèse, on observe des inconvénients importants résumés ci-après;

- * l'opération de diazotation lors de la première étape est difficile au niveau industriel et il existe de surcroît des réactions secondaires à l'issue de cette étape;
- * la réaction de condensation de Japp-Klingmann lors de la deuxième étape est laborieuse;
- * le dégagement d'azote est important;
- * la décarboxylation faite à haute température entraîne une grosse dépense d'énergie.

- Au cours de la deuxième partie de cette synthèse, on procède à la déméthylation de l'Ellipticine selon le brevet de Le Peck, Paoletti et Dat-Xuong (Brevet européen n° 9445, 1979). Cette opération est difficile car elle nécessite une température élevée qui provoque la dégradation des composés produits. De plus, la purification nécessaire pour éliminer les impuretés issues de cette synthèse est également difficile.

Cette synthèse du 9-OH ellipticinium est donc longue et coûteuse. Les inconvénients sont nombreux et les rendements globaux sont faibles : 13,8 % à partir du méthoxy-5 indole et 7,6% à partir de la para-anisidine.

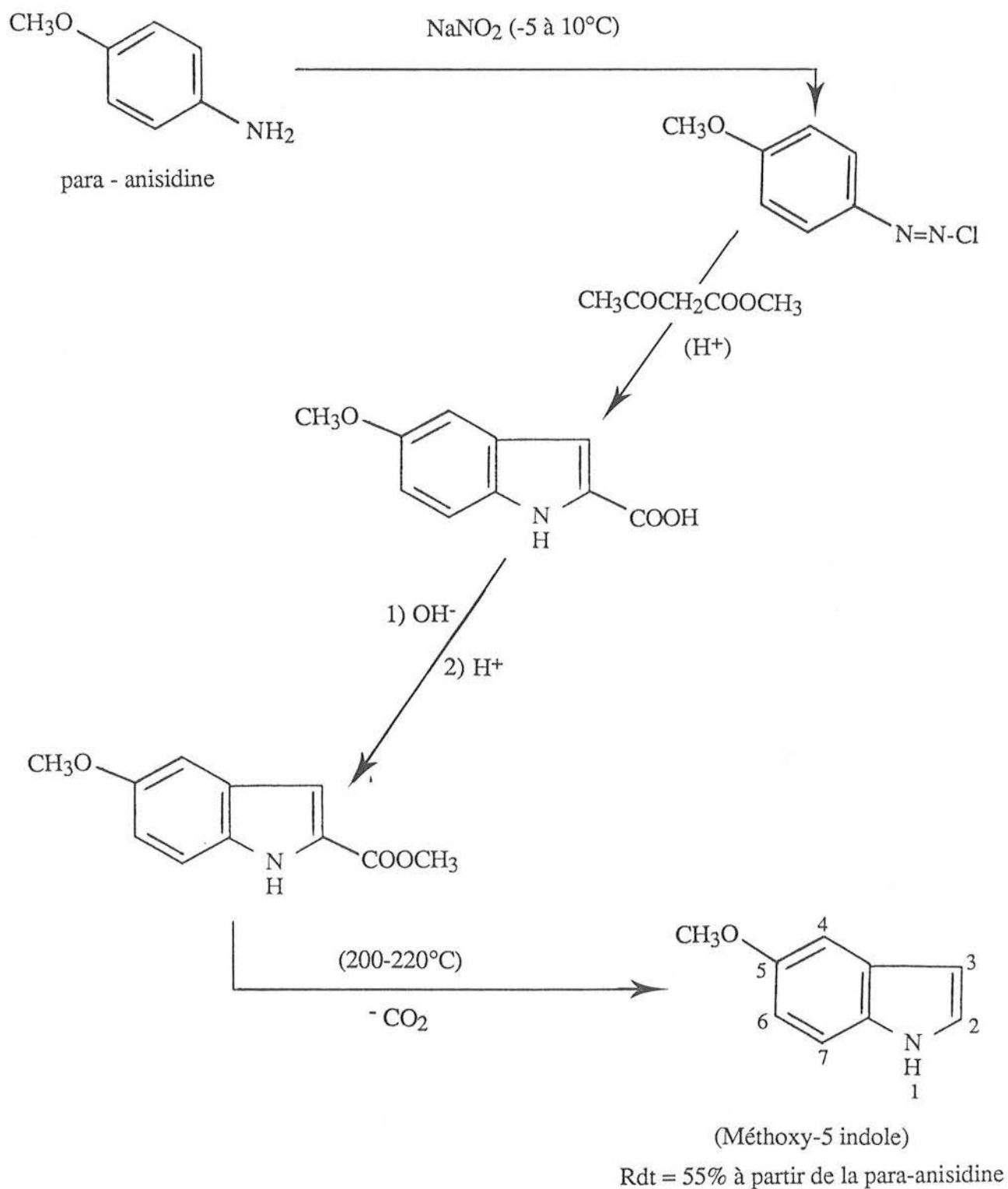
1 - PREPARATION DU METHOXY-5 INDOLE

FIGURE I.6A : SCHEMA ACTUEL DE SYNTHÈSE DE L'ACÉTATE D'ELLIPTICINIUM (CELIPTIUM®).

2 - PREPARATION DU 9-HYDROXY ELLIPTICINIUM
A PARTIR DU METHOXY-5 INDOLE

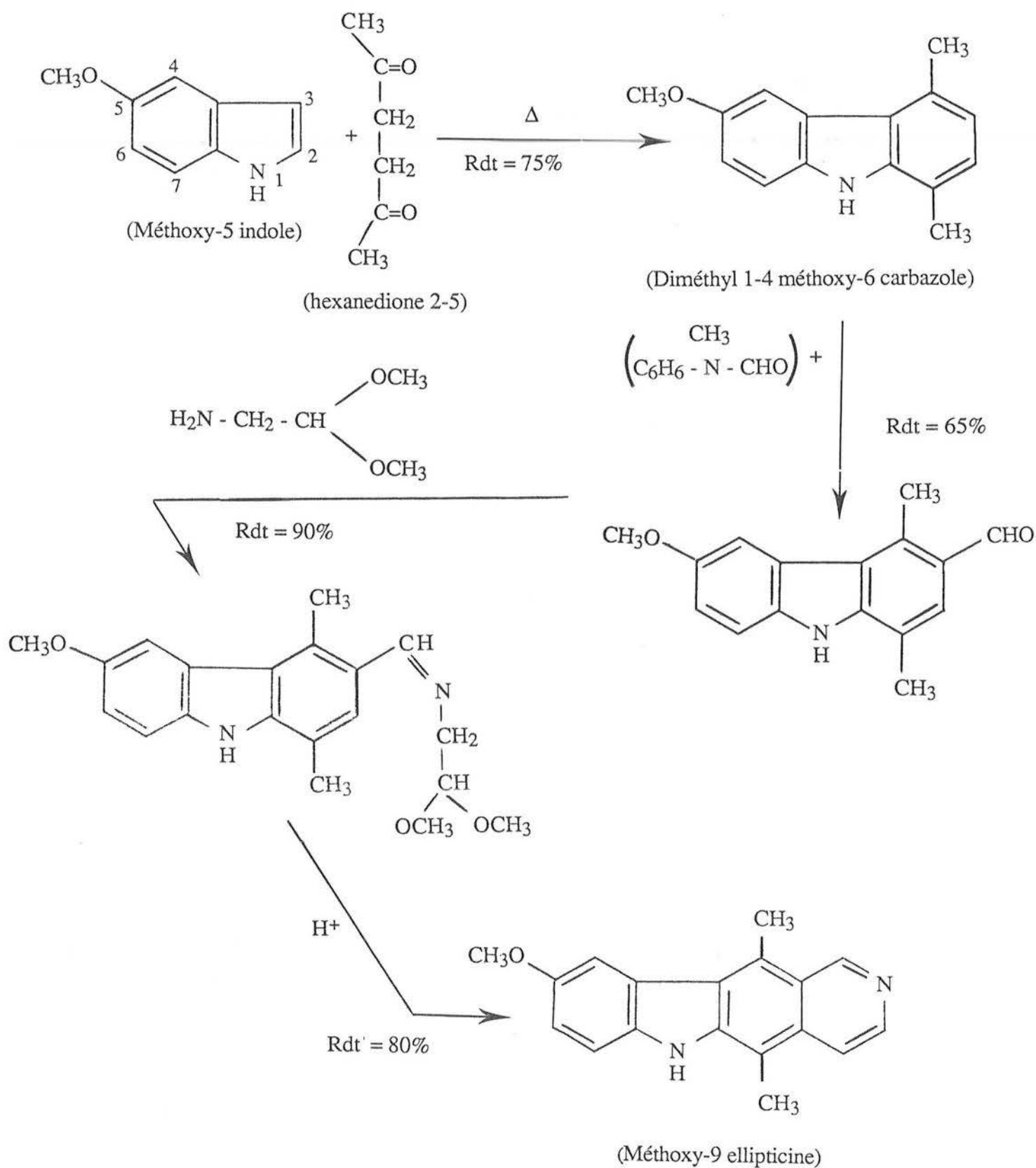


FIGURE I.6B : SCHEMA ACTUEL DE SYNTHESE DE L'ACETATE D'ELLIPTICINIUM (CELIPTIUM®).

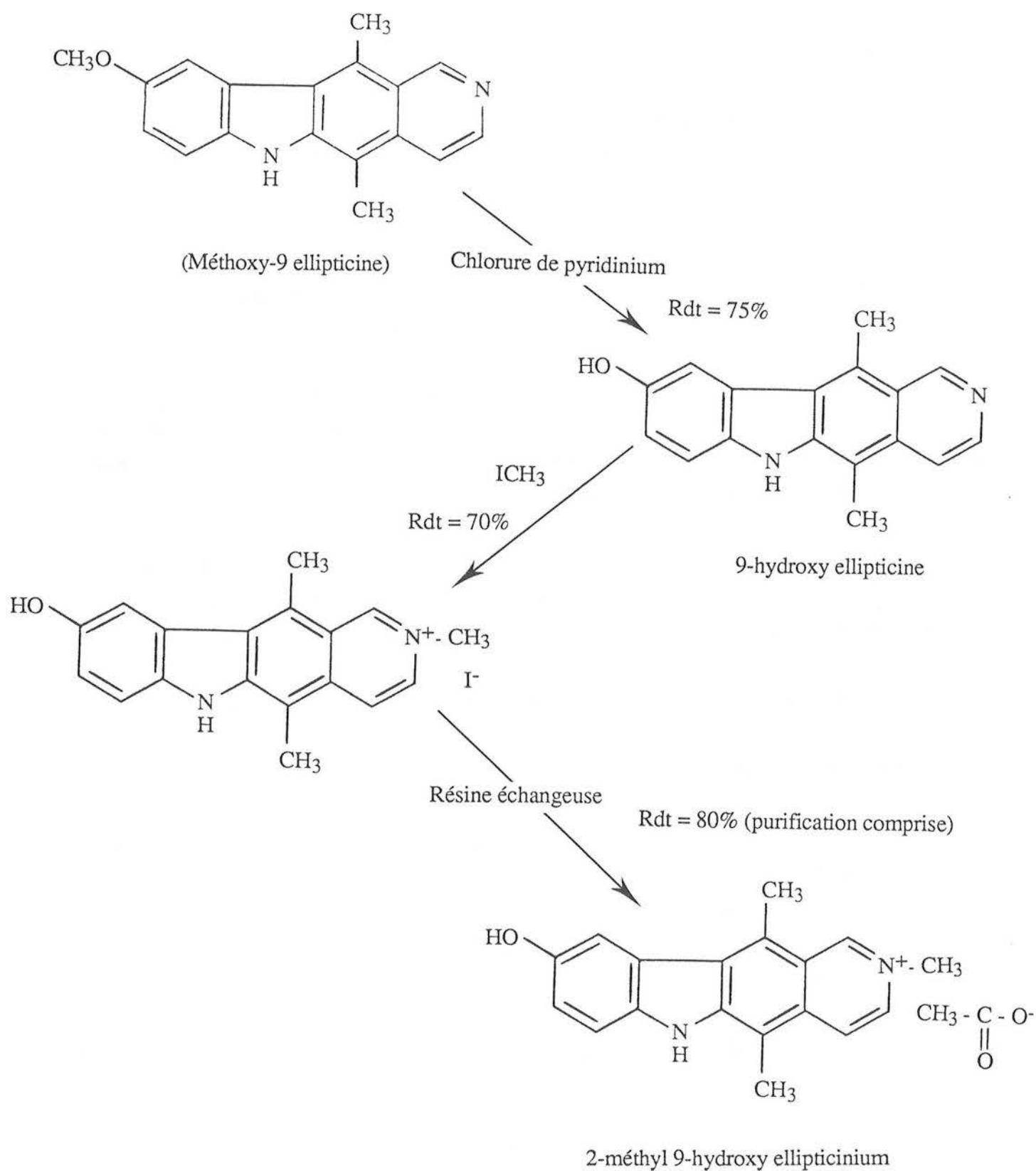


FIGURE I.6B (suite) : SCHEMA ACTUEL DE SYNTHÈSE DE L'ACÉTATE D'ELLIPTICINIUM (CELIPTIUM®).

I.2 - SCHEMA DE CONVERSION ENVISAGE

Les nombreux inconvénients de la méthode actuelle utilisée pour la production du 9-OH ellipticinium ont été des arguments en faveur de la recherche d'une autre voie de synthèse. Ce dérivé, d'un intérêt médical évident, est tributaire de son coût de production.

Nous avons noté précédemment le schéma du métabolisme de l'Ellipticine qui était transformée en 9-OH ellipticine par le système des monooxygénases à cytochrome P-450 du foie chez les mammifères. A partir de ce constat, l'idée générale est d'utiliser un système biologique ou chimique contenant un tel système enzymatique et permettant la réalisation de cette conversion.

En effet, la voie biologique utilise des matières premières d'un prix nettement plus faible et répond ainsi à des préoccupations économiques. Elle possède de plus un avantage certain vis-à-vis de la voie de production actuelle dans la mesure où tous les composés à activité antitumorale prédictive importante sont hydroxylés en position 9.

Le but de ce travail sera donc de substituer au schéma actuel de synthèse du 9-OH ellipticinium un procédé constitué par une hydroxylation enzymatique au moyen du système de monooxygénases qui constituera la pierre angulaire de notre étude.

Il est possible de retenir deux hypothèses de travail précisées sur la Figure I.7.

* HYPOTHESE 1 : Elle comprend quatre phases principales :

- Préparation du précurseur : l'Ellipticine en 4 réactions chimiques à partir de l'indole qui est une matière première courante, 30 fois moins chère que le méthoxy-5 indole
- Hydroxylation enzymatique sur la position 9 de l'Ellipticine
- Iodométhylation de la position 2 de l'hydroxy-9 ellipticine
- Passage de l'iodométhylate à l'acétométhylate d'hydroxy-9 ellipticinium.

Au total, cette première hypothèse permet de préparer le produit final en 7 étapes à partir de l'indole.

* HYPOTHESE 2 : Elle comprend 2 phases principales à partir de l'Ellipticine :

- Préparation de l'acétométhylate d'ellipticinium en 2 réactions chimiques à partir de l'Ellipticine (iodométhylation et acétométhylation)
- Hydroxylation enzymatique en position 9 de l'acétométhylate d'ellipticinium.

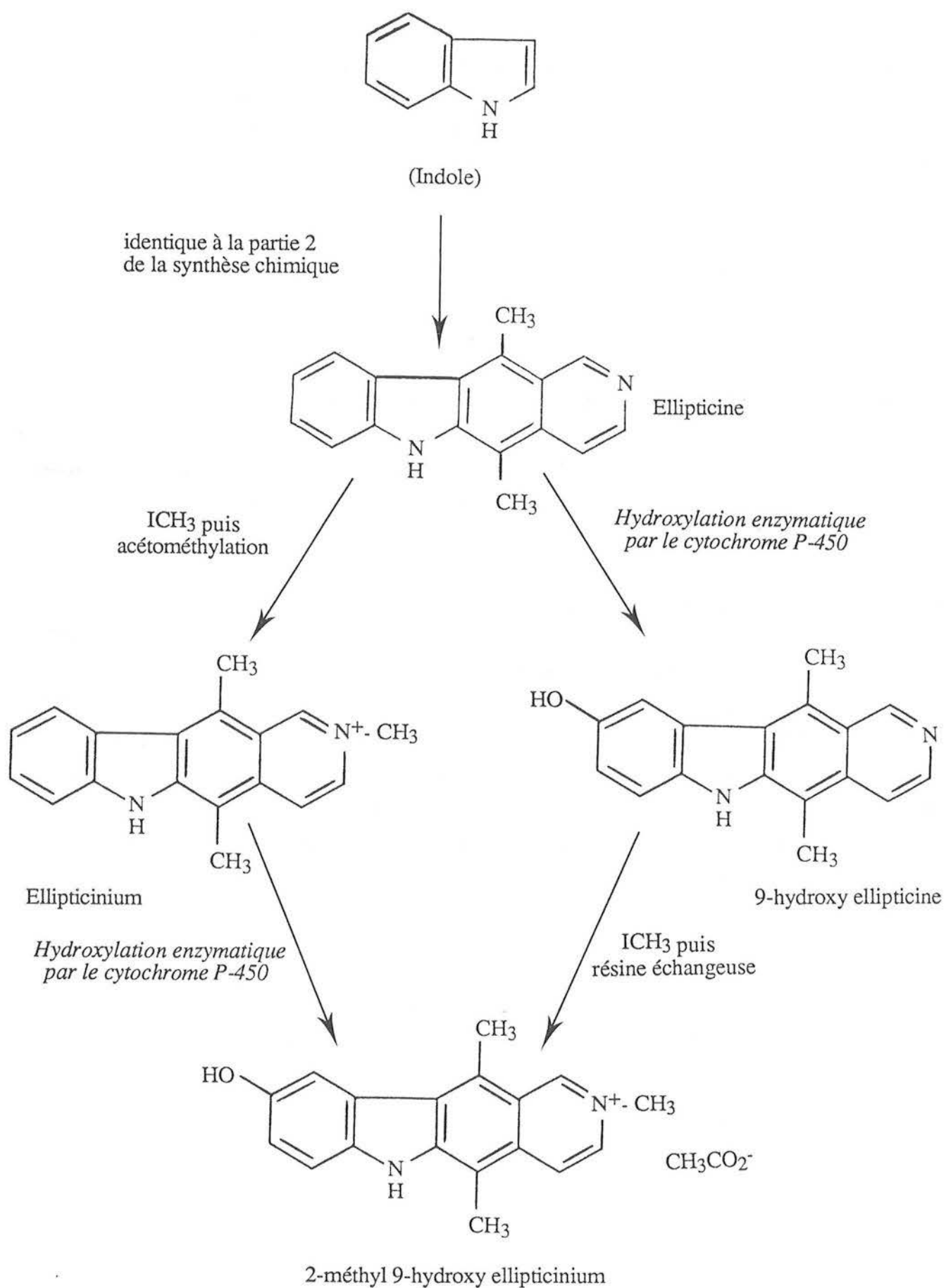


FIGURE I.7 : SCHEMA ENVISAGE AVEC VOIE PARTIELLEMENT BIOLOGIQUE.

Pour ces deux hypothèses, on constate que l'acétométhylate d'hydroxy-9 ellipticinium est accessible à partir de l'indole en 7 étapes au lieu de 18 selon le procédé actuel.

Si l'hydroxylation en position 9 de l'Ellipticine ou de son acétométhylate conduit à un résultat positif, il en résulterait un abaissement important du prix de revient. Ensuite, les conditions opératoires beaucoup plus douces devraient nous permettre d'obtenir des produits plus propres et, par la suite, simplifier la phase de précipitation des intermédiaires et du produit fini.

Le choix de l'hypothèse de travail sera décidé après la détermination du système biologique de conversion.

I.3 - LE SYSTEME DES MONOOXYGENASES A CYTOCHROME P-450

L'Ellipticine, comme un grand nombre de substances chimiques de notre environnement (médicaments, solvants, insecticides, dérivés du pétrole, etc...), est fortement hydrophobe. Ces substances ne peuvent donc être facilement éliminées par les organismes vivants et sont transformées par des enzymes en espèces moins actives et plus faciles à éliminer par ces mêmes organismes. Le métabolisme s'effectue en deux étapes successives [5,44] :

1°/ introduction d'un groupement polaire

2°/ addition d'une molécule hydrophile sur le groupement polaire et formation de métabolites qui seront excrétés facilement.

Ces enzymes qui catalysent le métabolisme de composés exogènes (xénobiotiques) et endogènes sont appelées cytochrome P-450 [5,44,74,75]. Les réactions avec les monooxygénases catalysées par le cytochrome P-450 sont prédominantes dans le métabolisme oxydatif des xénobiotiques dans les tissus animaux.

I.3.1 - DÉFINITION

Ce système a été découvert, dans les années 1950, dans des microsomes de foie de rat à la suite d'expériences sur la transformation de substances par des oxydases à fonction mixte. Le caractère spectral (en U.V.) inhabituel surprit puisque la forme réduite de ce système se combinait au monoxyde de carbone pour former un complexe absorbant à 450 nm [76,77]. Des investigations plus poussées avaient montré que sa présence était ubiquitaire [76]. Enfin, Omura et Sato [78] établirent la nature hémoprotéique de ce pigment microsomal et sa conversion relativement rapide à une forme inactive qui absorbait à la longueur d'onde maximale de 420 nm.

Les cytochromes P-450 sont donc des hémoprotéines de masse molaire comprise entre 45 000 et 56 000 g [79]. Les cytochromes P-450 ont en commun une protoporphyrine de fer au niveau du site actif [75,80]. Le spectre visible de l'hémoprotéine réduite présente un bande intense à 450 nm après formation d'un dérivé carbonylé.

Chez les mammifères, le cytochrome P-450 est associé à des structures membranaires [74,75]. Estabrook [79] classe les cytochromes P-450 en deux catégories :

- la catégorie A, essentiellement au niveau des mitochondries. Ces cytochromes P-450 sont associés à une flavoprotéine contenant du FAD et à une protéine contenant du fer et du soufre pour le transfert électronique à partir du NADPH,
- les cytochromes P-450 de la catégorie B se trouvent au niveau des microsomes. Ils sont associés à une flavoprotéine contenant du FAD et du FMN ainsi qu'au cytochrome b₅.

La concentration de cytochrome P-450 dans le foie de rat est de l'ordre de 30 à 40 nmol.g⁻¹ de tissu frais . Des injections répétées de phénobarbital vont induire ce cytochrome. Sa concentration peut être multipliée par cinq.

Il est rapidement apparu que le cytochrome P-450 ne constitue pas une famille homogène. C'est ainsi que la longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe cytochrome P-450 réduit - CO varie selon les inducteurs de 444 à 452 nm. Par chromatographie et électrophorèse, de nombreuses équipes ont séparé plusieurs formes de cytochrome P-450 [81].

I.3.2 - ACTION CATALYTIQUE DU CYTOCHROME P-450

L'hydroxylation des composés organiques exogènes par des monooxygénases a lieu dans un grand nombre d'organes mais surtout au niveau du foie. Ces monooxygénases, situées au niveau du réticulum endoplasmique sont des systèmes multi-enzymatiques capables de transférer des électrons du NADPH vers l'oxygénase terminale, le cytochrome P-450 [5].

Le cytochrome P-450 fixe l'oxygène moléculaire et l'active par transfert d'électrons avant de le fixer sur le substrat organique selon la réaction :



Un atome d'oxygène est réduit en eau, l'autre est transféré vers le substrat pour former le plus fréquemment un groupement hydroxyl.

CYTOPLASME

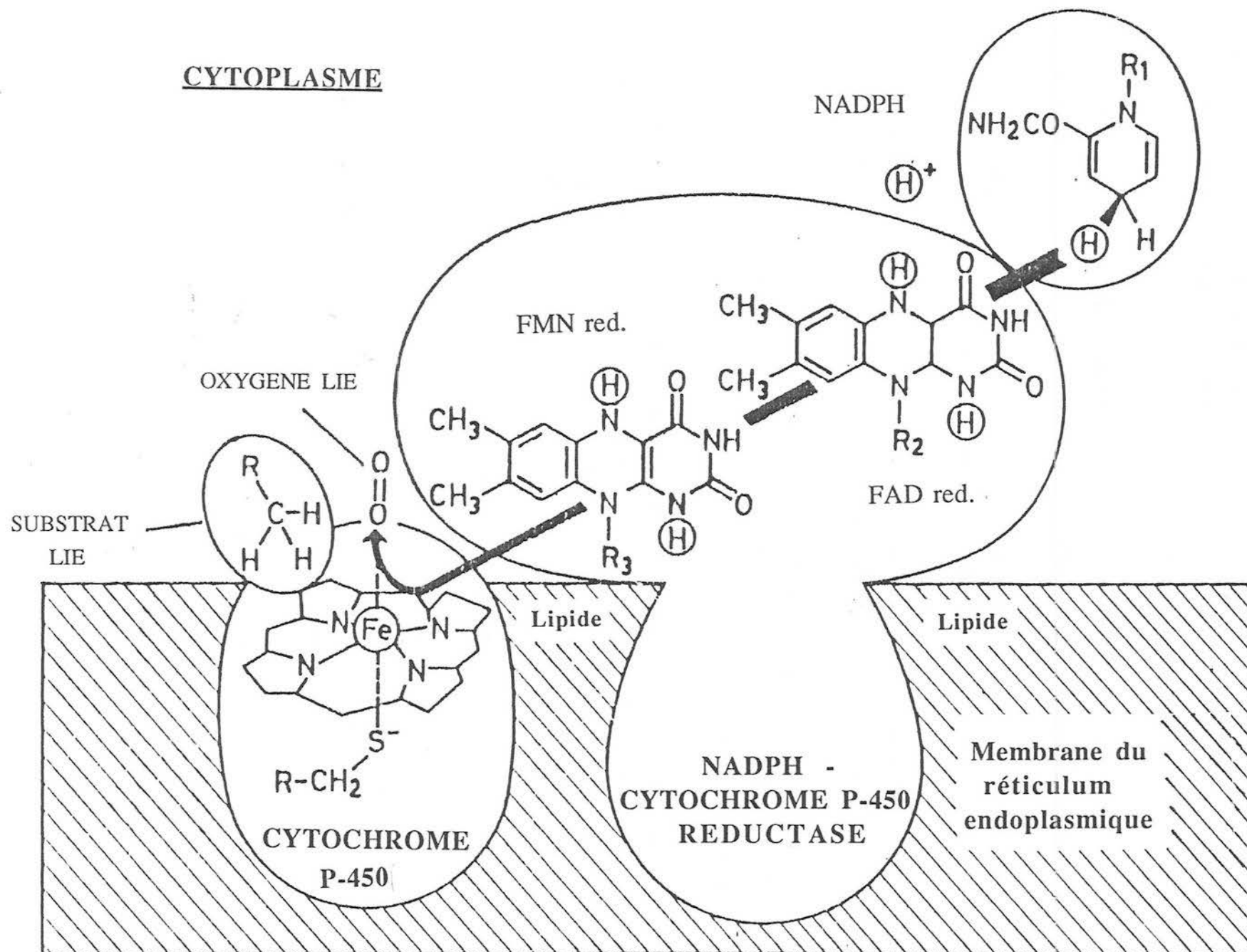


FIGURE I.8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CONSTITUANTS DU SYSTEME DES MONOOXYGENASES A CYTOCHROME P-450 [82].

La Figure I.8 donne une représentation schématique des différents éléments intervenant dans la composition du cytochrome P-450 et son principe succinct de fonctionnement [82].

Le système enzymatique du cytochrome P-450 est étonnamment non spécifique : il est capable d'hydroxyler n'importe quel composé chimique qui comporte une partie hydrophobe. En fait, les cytochromes P-450 du système détoxifiant des organismes vivants constituent un remarquable ensemble chimique pour deux raisons :

- ils sont capables de réagir sur n'importe quel composé chimique;
- ce sont les agents oxydants les plus puissants connus en biochimie puisqu'ils sont capables d'oxyder des hydrocarbures aliphatiques comme le n-hexane[5].

A cause de ces propriétés, ils réalisent des réactions extrêmement variées, et comme celles-ci se produisent au sein même de la cellule, elles ont des implications importantes en pharmacologie, toxicologie, chimie, carcinogénèse, etc... [77].

I.3.2.1 - Mécanisme d'oxydation d'un substrat catalysée par le cytochrome P-450

De nombreux auteurs ont élaboré des schémas de principe concernant ce mécanisme. Nous nous contenterons d'en faire simplement un résumé illustré par un graphique représentatif.

L'holoprotéine isole la porphyrine de fer du milieu aqueux extérieur et la catalyse se fait en cinq étapes :

- fixation du substrat par interaction hydrophobe sur la protéine. Le complexe devient pentacoordiné tandis que le potentiel rédox augmente,
- réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} par un électron qui vient du NADPH par la NADPH cytochrome P-450 réductase,
- fixation réversible de l'oxygène sur le site de coordination vacant du Fe^{2+} ,
- réduction de l'oxycytochrome P-450. On obtient un complexe possédant un oxygène actif qui s'insère sur le substrat,
- libération du produit.

La Figure I.9 résume les données concernant cette oxydation des xénobiotiques, proposée par Smith et Rosazza [83].

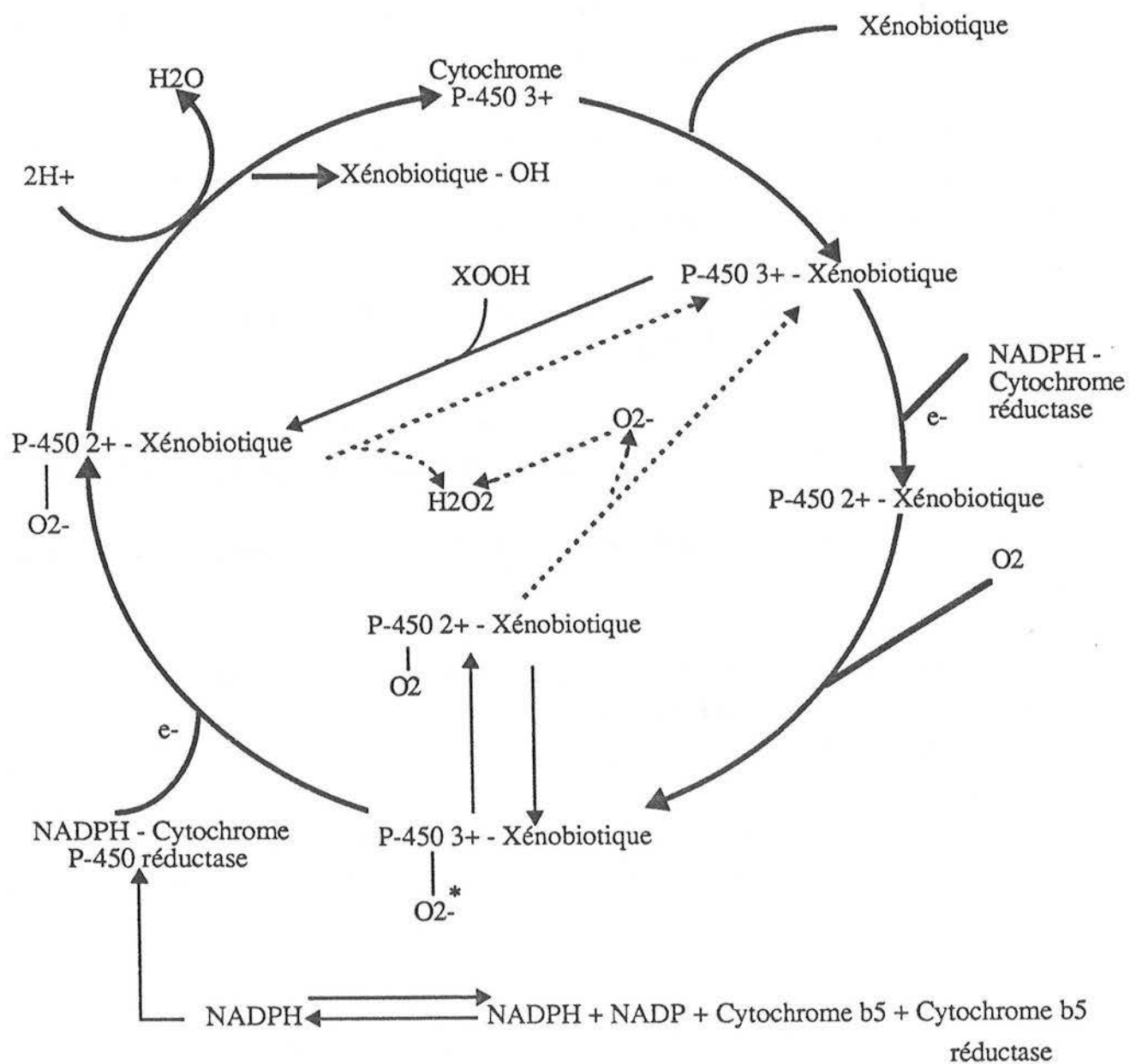


FIGURE I.9 : OXYDATION DES XENOBIOTIQUES VIA LE CYTOCHROME P-450
LIE AUX MONOOXYGENASES [83].

I.3.2.2 - Conséquences des réactions catalysées par le cytochrome P-450

La première conséquence est la détoxification de l'organisme puisque RH et ROH sont, en principe, inertes chimiquement par rapport à la cellule. ROH va se conjuguer avec un composé pour donner des sulfates ou des glucuronides et sera ensuite éliminé [5].

Une autre conséquence, et non des moindres, est la formation de métabolites réactifs [84]. Les substrats sont transformés en réactifs électrophiles puissants susceptibles de réagir rapidement avec des réactifs nucléophiles, par exemple -OH, -NH, -SH, des protéines et des acides nucléiques. La cellule ne peut plus alors exercer sa fonction normale d'où l'apparition de lésions se développant lors de l'activation de certains médicaments [84,85]. Le métabolisme de l'Ellipticine que nous avons déjà décrit est à relier avec ce phénomène.

On peut citer des exemples de molécules ainsi activées :

- des dérivés insaturés formant des époxydes très réactifs comme le furosémide, les aflatoxines et le benzo-3,4 pyrène qui est le plus mutagène;
- certains dérivés aminés formant des hydroxylamines réactives comme le paracétamol;
- des amines qui subissent des désalkylations avec l'exemple des nitrosamines.

Il apparaît le plus souvent que les réactions conduisant à un métabolite électrophile dangereux pour la cellule sont toujours en compétition avec des réactions réelles de détoxification.

La destruction du cytochrome P-450 est possible par le fluroxène, les allyl-barbituriques. Son blocage est réalisé par la coordination de certaines substances sur le Fe^{2+} empêchant l'oxygène de se coordonner et bloquant ainsi le site catalytique [84]. On peut citer notamment les amphétamines ou les N-hydroxylamines aliphatiques.

On pourrait encore décrire d'autres réactions telles que la réduction de substrats au niveau du cytochrome P-450 réduit. Cependant, nous n'avons voulu qu'aborder ce vaste sujet. En conclusion, aux capacités réactionnelles très variées des cytochromes P-450 correspondent des implications pharmacologiques et toxicologiques très diverses. Malgré leurs rôles détoxifiants bénéfiques, ils peuvent avoir un rôle néfaste de producteurs de métabolites dangereux.

Cependant leur non-spécificité et l'immense champ d'action des cytochromes P-450 en font un système multi-enzymatique permettant une détoxification et par conséquent une adaptation à l'environnement.

L'utilisation des capacités exceptionnelles de ce système multi-enzymatique pour réaliser des synthèses organiques est naturellement venue à l'esprit de nombreux chercheurs et industriels.

Ce système recèle donc la possibilité de bioconversions et sa présence chez tous les organismes vivants y compris chez les microorganismes, les plus faciles à étudier, laisse entrevoir des possibilités intéressantes d'utilisation. Nous allons donc maintenant nous attacher à voir quelles solutions ont été imaginées ou découvertes pour la transformation des Ellipticines par un système enzymatique.

I.4 - LE SYSTEME DE BIOCONVERSION

Le système de bioconversion fait nécessairement appel à des organismes vivants intégrant plusieurs contraintes : la simplicité d'emploi, l'industrialisation possible et le faible coût de l'installation. La notion relative d'un meilleur rendement que celui obtenu par synthèse chimique est, à l'évidence, une condition à remplir sans négliger la pureté du produit et le coût énergétique de l'opération.

I.4.1 - LES DIFFÉRENTES SOLUTIONS POSSIBLES

La culture de cellules animales ou végétales, la culture de microorganismes ou l'obtention de microsomes font partie des solutions envisageables à un tel problème.

I.4.1.1 - La voie des microsomes

Cette solution avait primitivement retenu l'attention pour la transformation de l'Ellipticine en un dérivé 9-hydroxylé.

En effet, comme les cytochromes P-450 sont localisés essentiellement dans le réticulum endoplasmique des cellules de foie chez les mammifères, on a recueilli ce système enzymatique dans des structures appelées microsomes. Ce sont des vésicules, constituées de morceaux de membranes autour desquelles on trouve des ribosomes, obtenues classiquement après homogénéisation des tissus et centrifugation différentielle.

De nombreux protocoles expérimentaux ont été décrits. Il a été montré que cette solution donnait des résultats pour l'obtention soit de 9-OH ellipticine à partir de l'Ellipticine [49], soit paradoxalement de 2-CH₃,9-OH ellipticinium à partir du 2-CH₃ ellipticinium [50]. L'immobilisation de ces systèmes microsomaux présente des avantages de simplicité et de réutilisation s'il n'y a pas de perte d'activité enzymatique au cours du temps.

Bouzon [86] a donc expérimenté l'activité enzymatique de microsomes immobilisés contenant du cytochrome P-448 ou P-450 - deux formes qui diffèrent uniquement selon l'inducteur utilisé - sur certaines substances. Il a étudié l'activité O-déméthylase sur le paranitroanisol et l'activité

O-dééthylase sur l'éthoxycoumarine. Il a constaté que non seulement l'immobilisation n'enraie pas une dénaturation et une perte d'activité au cours du stockage à 4°C mais que le rendement total est de moitié inférieure à celui des microsomes libres.

S'il conclue sur la nécessité des méthodes d'immobilisation douces, il apparaît que les performances atteintes par cette technique ne sont pas celles escomptées.

Peu de travaux furent réalisés sur une voie très proche de celle des microsomes : la reconstitution du cytochrome P-450 avec une NADPH cytochrome P-450 réductase, un cytochrome P-450 et un phospholipide coupleur d'électrons. Il semble que l'activité soit difficilement préservée [5]. La reconstitution de différents éléments du cytochrome P-450, provenant d'une fraction mitochondriale, apparaît d'autre part possible [87].

I.4.1.2 - Les cultures cellulaires

L'idée des cultures cellulaires, riches en cytochrome P-450 a toujours constitué un attrait majeur pour les industriels depuis les développements des techniques de cultures cellulaires animales ou végétales *in vitro*.

a) Les cellules animales

En 1977, Smith et al.[88] estimaient que les résultats obtenus sur cultures cellulaires *in vitro* et ceux trouvés *in vivo* avaient un écart trop important. Le manque de corrélation constaté nuisait, selon eux, à l'établissement d'une lignée cellulaire recelant le système des monooxygénases à cytochrome P-450 pour la conversion de l'Ellipticine en un dérivé hydroxylé.

Malgré cela, quelques auteurs ont tenté des cultures d'hépatocytes. Bègue et al. [89] ont établi des co-cultures d'hépatocytes de rat mélangés à des cellules épithéliales de la même espèce. Guillouzo et al. [90] ont ensuite réussi des co-cultures d'hépatocytes humains avec des cellules épithéliales de rat.

Ce système de culture d'hépatocytes présente l'incontestable avantage de reproduire exactement *in vitro* le phénomène de détoxification de substances exogènes chez l'homme, ce qui nous autoriserait à réaliser l'oxydation enzymatique de l'Ellipticine. Parallèlement à cette constatation, il paraît également évident que des cellules hépatiques cultivées en lignée continue permettraient des avancées considérables dans le domaine de la pharmacologie et de la toxicologie.

Malheureusement, il n'existe pas encore de lignée continue d'hépatocytes. De plus, il semble difficile de maintenir l'activité des monooxygénases pendant plusieurs jours, voire même plusieurs heures.

b) Les cellules végétales

Les données sur ce thème apparaissent de plus en plus nombreuses.

Kurz et Constabel [91] ont défini les grandes lignes à suivre pour développer et industrialiser les cultures de cellules végétales pour la production de substances pharmaceutiques. D'autres auteurs ont essayé de tels systèmes servant notamment à la production d'alcaloïdes indoliques [81] : ils ne procèdent qu'à une analyse globale de ces alcaloïdes produits par la souche *Catharanthus roseus* en fermenteur. Les délais de production paraissent longs pour obtenir des taux de conversion corrects (15 à 25 jours). Il semble cependant difficile de cultiver des cellules de plantes produisant de l'Ellipticine.

D'autre part, il n'a pas été montré de relation d'induction ou d'inhibition des cytochromes P-450 végétaux par certaines substances chimiques comme le ketoconazole par exemple [92].

On peut néanmoins citer la réussite d'une biotransformation de l'Ellipticine en 5-formyl ellipticine par la souche *Choisya ternata* [93].

I.4.1.3 - La voie microbienne

La voie microbienne s'est révélée très intéressante pour la biotransformation de substances normalement métabolisées par les monooxygénases du foie chez l'homme.

Plusieurs auteurs ont travaillé sur ce problème [31,83,94,95]. Smith et Rosazza [96,97] ont montré que les microorganismes étaient capables de mimer le système enzymatique des mammifères qui transforment les médicaments en dérivés beaucoup moins toxiques et que l'on pouvait s'en servir pour effectuer des synthèses préparatives de ces substances.

Chez les mammifères, dans une première étape, les composés aromatiques sont convertis en phénols lors des réactions de transformation et ces derniers sont aussi produits comme métabolites microbiens majeurs [98].

Les bactéries, organismes procaryotes, possèdent des systèmes à monooxygénases mais néanmoins différents des systèmes enzymatiques caractérisés chez les champignons et les levures. Ces monooxygénases jouent un rôle important dans la biotransformation des alcaloïdes [83].

Les fortes similarités dans les métabolismes et la manière avec laquelle ils oxydent les substrats aromatiques, ont permis le développement du concept de "modèle microbien du métabolisme des mammifères" [88,94,99].

Plusieurs auteurs, après des essais sur de nombreux hydrocarbures aromatiques (benzo[a]pyrène, benzo[a]anthracène, toluène, phénanthrène...), ont suggérés que les systèmes eucaryotiques utilisaient les monooxygénases dans le métabolisme de ces composés aromatiques [96].

Les champignons, notamment, auraient un processus très analogue à celui des mammifères, en particulier pour l'oxydation des composés aromatiques [96].

La variété des réactions potentielles obtenues par les microorganismes permettait tous les espoirs. Les essais effectués sur la pentoxifylline, la vinblastine et la vincristine (alcaloïdes indoliques) ont permis de démontrer que l'oxydation de ces alcaloïdes pouvait se faire au moyen de microorganismes eucaryotes [83,95,100]. Les Tableaux I.4 et I.5 présentent les bioconversions effectuées par les levures et par les champignons.

MICROORGANISMES UTILISES	SUBSTANCE TRANSFORMEE ET CONVERSION OBTENUE	REFERENCE
<i>Candida tropicalis</i>	Oxydation des alcanes et des acides gras ainsi que de l'aminopyrine, la benzophétamine, l'hexobarbital et l'éthylmorphine. N-déméthylation de l'aminopyrine. (croissance nécessaire sur du tétradécane)	[83,101] [101]
<i>Claviceps purpurea</i>	Métabolisme des alcaloïdes. (Le cytochrome P-450 est inductible par le phénobarbital).	[101]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Métabolisme des stérols et des acides gras insaturés.	[83]

TABLEAU I.4 : BIOCONVERSIONS EFFECTUEES PAR LES LEVURES.

Le système des monooxygénases microbiennes, à l'origine de cette transformation, a été étudié chez les différents types de microorganismes et plus particulièrement son induction.

Les bactéries :

Le système du cytochrome P-450, soluble, nécessite du NADH et a surtout été étudié chez *Pseudomonas putida*. L'induction de ce cytochrome se fait par le phénobarbital qui augmente l'activité d'un facteur 1,5. Cependant, ce système diffère de celui des mammifères par la spécificité du substrat et sa solubilité.

MICROORGANISMES UTILISES	SUBSTANCE TRANSFORMEE ET CONVERSION OBTENUE	REF.
<i>Aspergillus alliaceus</i> (QM 1915) (NRRL 315) (NRRL 315) (NRRL 315) (NRRL 315)	9-hydroxylation de l'Acronycine 8 et 9-hydroxylation de l'Ellipticine 8 et 9-hydroxylation de l'Ellipticine et autres métabolites de l'Ellipticine 8-hydroxylation (rendement 5%) et 9-hydroxylation (rendement 20%) de l'Ellipticine 8-hydroxylation (rendement 10%) et 9-hydroxylation (rendement 40%) de l'Ellipticine	[102] [44] [94] [83] [98]
<i>Aspergillus fumigatus</i> (UI 51)	hydroxylation des composés aromatiques	[94]
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 9142)	hydroxylation des composés aromatiques	[96],[98]
<i>Aspergillus ochraceus</i> (ATCC 1008)	hydroxylation des composés aromatiques	[96],[98]
<i>Botrytis allii</i> (NRRL 2502)	hydroxylation des composés aromatiques	[98]
<i>Cunninghamella blakesleeana</i> (ATCC 8688a)	hydroxylation des composés aromatiques	[96]
<i>Cunninghamella echinulata</i> (ATCC 9244) et (NRRL 315) (ATCC 9244) (NRRL 1386) (NRRL 3655)	9-hydroxylation de l'Acronycine (rendement 30%) oxydation de l'Anisol, l'Aminopyrine ainsi que du Nitroanisole et l'Aniline hydroxylation des composés aromatiques et production de 9-OH acronycine (rendement 31%) N-déméthylation de l'Aminopyrine, O-déalkylation du paranitroanisole et 4-hydroxylation de l'Aniline bonne conversion de l'Ellipticine bonne conversion de l'Ellipticine et 9-hydroxylation de l'Acronycine	[103] [83] [96] [101] [98] [98]
<i>Cunninghamella elegans</i> (non précisé)	oxydation du naphthalène	[83]
<i>Curvularia lunata</i> (NRRL 2178)	immobilisation des spores et conversion des stéroïdes conversion de l'Ellipticine	[104] [96],[98]
<i>Gliocladium deliquescens</i> 1086	hydroxylation des composés aromatiques	[96],[98]
<i>Helicostylum piriforme</i> (QM 6945)	hydroxylation des composés aromatiques	[73],[50]
<i>Penicillium brevi-compactum</i> (ATCC 10418)	9-O-déméthylation de la 9-méthoxy ellipticine qui donne de la 9-hydroxy ellipticine. Selon d'autres auteurs, le rendement serait de 31 %	[105] [98]
<i>Penicillium chrysogenum</i> (ATCC 10002)	hydroxylation des composés aromatiques	[96],[98]
<i>Penicillium purpurogenum</i> (UI 193)	hydroxylation des composés aromatiques	[94]
<i>Rhizopus nigricans</i> (non précisé)	11 alpha-hydroxylation de la progestérone	[83]
<i>Rhizopus stolonifer</i> (NRRL 1472)	hydroxylation des composés aromatiques	[96],[98]
<i>Streptomyces rimosus</i> (ATCC 23955)	hydroxylation des composés aromatiques	[96],[98]
<i>Streptomyces species</i> (non précisé)	hydroxylation des composés aromatiques	[96],[98]

TABLEAU I.5 : BIOCONVERSIONS EFFECTUEES PAR LES SYSTEMES FONGIQUES.

Il semble que le système du cytochrome P-450 bactérien ressemble plutôt au cytochrome P-450 extrahépatique des mammifères [98,101].

Les champignons :

Le système des monooxygénases à cytochrome P-450 fongiques requièrent du NADPH et fait partie de nombreux processus physiologiques, avec notamment l'oxydation des alcanes et des alcaloïdes.

Les propriétés des systèmes fongiques décrits dans le Tableau I.5 sont très similaires à celles des systèmes hépatiques à cytochrome P-450 des microsomes. En effet, le spectre différentiel avec liaison à l'oxyde de carbone donne un maximum d'absorption en U.V. très net à 450 nm, ce qui démontre la présence du système des monooxygénases à cytochrome P-450.

L'induction de ce système se fait par le phénanthrène et non pas, comme on aurait pu s'y attendre, par le phénobarbital et le 3-méthyl cholanthrène (inducteurs classiques chez les animaux du cytochrome P-450). Récemment, une équipe de chercheurs a purifié et caractérisé le cytochrome P-450 d'une souche de *Streptomyces griseus* induit par un milieu de culture à base de soja [106].

Ces systèmes sont, en revanche, inhibés par la métyrapone.

Les levures :

La plupart des levures contiennent des formes de particules solubles du cytochrome P-450 et requièrent en général du NADPH. Proche du système des champignons, probablement aussi complet, le système de *Candida tropicalis* a surtout intéressé les chercheurs [107,108].

Induit par une croissance sur une source de carbone comme le tétradécane, le système des monooxygénases à cytochrome P-450 peut être aussi induit par du phénobarbital ou par un milieu contenant 20% de glucose mais non par les deux à la fois.

Il a été démontré une interconversion de deux formes de cytochromes : P-450 et P-420 sur la souche *Claviceps purpurea* [109].

En fait, peu de levures contenant le système du cytochrome P-450 ont été décrites, mais il y a surtout très peu d'informations décrivant l'oxydation des alcaloïdes indoliques en phénols.

I.4.1.4 - Les systèmes immobilisés

L'avantage des systèmes immobilisés, largement utilisés dans l'industrie alimentaire, est leur coût limité lié à leur réutilisation.

L'utilisation ou la réutilisation pendant de longues périodes des enzymes immobilisées est surtout due à l'augmentation de leur stabilité grâce aux progrès faits dans la maîtrise des techniques d'immobilisation [110].

De nombreux essais ont été tentés pour la conversion des stéroïdes. Ainsi, Mosbach et Larsson [111] ont ouvert la voie en préparant des microorganismes et des enzymes immobilisées

pour les procédés de transformation concernant la 11- β -hydroxylation du cortexolone en cortisol. Ils ont ainsi immobilisé *Curvularia lunata* en gel réticulé de polyacrylamide pour procéder à cette 11- β -hydroxylation. Il est aussi possible de faire germer *in situ* dans un gel d'alginate de calcium des spores de *Curvularia lunata* [104]. Cette transformation se fait couramment par culture en milieu liquide et approche 50% de rendement environ. D'autres auteurs ont répété ce système immobilisé en utilisant *Cunninghamella elegans* [112]. Les taux de conversion obtenus sont inférieurs de moitié à ceux obtenus en utilisant le mycélium.

Des modifications ont ensuite été apportées aux méthodes et matériaux d'immobilisation avec *Curvularia lunata* et la production d'hydroxycortisone [113] ou avec *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus phoenicis* pour la 11- α -hydroxylation de la progestérone [114,115]. Les gels testés étaient des pré-polymères d'uréthane hydrophiles [113], des grains d'alginate de calcium ou de la résine époxy [115].

Dernièrement, des auteurs ont essayé un système de production d'alcaloïdes indoliques sur des cellules immobilisées de *Catharanthus roseus* dans un réacteur continu [116].

L'immobilisation directe du système des monooxygénases à cytochrome P-450 a été essayée : les auteurs co-immobilisaient le système enzymatique avec la glucose oxydase ce qui permettait de remplacer le co-facteur NADPH par de l'eau oxygénée formée par l'oxydation enzymatique du glucose [117]. Le rendement d'activité, estimé à 60%, ne semblait pas modifier la stabilité fonctionnelle de l'enzyme.

Ces techniques qui se développent donc largement seraient, bien sûr, l'aboutissement idéal des recherches avec un système facile à mettre en œuvre, réutilisable et stable.

I.4.2 - CHOIX DU SYSTEME DE BIOTRANSFORMATION

La voie des microsomes présente bien des inconvénients : technique lourde et onéreuse, utilisation d'animaux, faisabilité industrielle difficilement envisageable. Bouzon [86] a montré une nette perte d'activité des enzymes dans le cas des microsomes immobilisés. Il apparaît donc que cette technique n'offre pas suffisamment d'avantages pour être utilisée.

En ce qui concerne les cultures de cellules animales, d'autres types de problèmes surgissent. Il n'existe pas, en effet, de lignée continue d'hépatocytes. Par conséquent, la technique reste encore lourde, onéreuse, tributaire d'animaux. De plus, le maintien de l'activité des monooxygénases pendant plusieurs heures reste difficile à obtenir.

Les cellules végétales, bien que pour le moment moins étudiées, semblent mieux répondre à nos besoins. Hélas, la difficulté d'entretien, la reproductibilité, la fiabilité et les rendements faibles obtenus sont des éléments encore mal maîtrisés.

La voie microbienne se détache nettement de toutes ces techniques par sa simplicité, son faible coût et des rendements potentiels plus intéressants. Notre choix s'est donc fondé sur ces critères :

- d'abord la facilité d'obtention des microorganismes, matière première auto-renouvelable;
- puis la relative simplicité d'entretien et de croissance de ces systèmes vivants;
- enfin, la possibilité, démontrée par la bibliographie, d'une conversion effective d'alcaloïdes indoliques par le système des monooxygénases à cytochrome P-450.

Au sein de ces microorganismes, les systèmes fongiques apparaissent, sans conteste, les plus aptes à aboutir à la conversion de l'Ellipticine en 9-OH ellipticine. D'une part, ces structures eucaryotes relativement proches du système humain sont capables de procéder à une transformation de l'Ellipticine par le système enzymatique du cytochrome P-450 d'une façon quasi-identique à celle des mammifères. D'autre part, les systèmes fongiques recèlent de formidables potentialités enzymatiques déjà illustrées par le nombre important de substances produites par ces microorganismes et utilisées quotidiennement en médecine. Enfin les rendements immédiats obtenus par quelques équipes travaillant sur ce sujet sont intéressants.

L'optimisation de tous les paramètres intervenant dans un tel process - composition des milieux de culture (source de carbone, source d'azote...), conditions de culture (température, agitation, oxygénation, croissance en phase exponentielle...), introduction de notre substance à transformer, temps de transformation, etc... - doit nous conduire à l'amélioration notable des capacités de transformation de notre champignon en vue de la production de la 9-hydroxy ellipticine.

Le choix de notre système transformant implique un autre choix : travailler avec la forme hydrophobe ou avec la forme quaternisée ? Etant donné le système utilisé et les fondements bibliographiques, nous avons opté pour l'Ellipticine. Cette décision a été motivée par trois raisons :

- l'Ellipticine, très hydrophobe, pourra être plus facilement extraite et isolée en vue de l'analyse des dérivés éventuellement produits que la forme quaternisée;
- la forte affinité de cette substance au cytochrome P-450 évitera, *a priori*, trop de pertes tout en déterminant les capacités réelles du microorganisme;
- il est plus facile de procéder à une iodométhylation sur la 9-OH ellipticine qu'à une iodométhylation suivie d'une acétométhylation sur l'Ellipticine (cf.Figure I.7).

Ainsi, avant d'aborder une éventuelle immobilisation de ces systèmes fongiques ou d'enzymes capables de transformer l'Ellipticine, il nous paraît nécessaire de vérifier cette hypothèse décrite sur des systèmes libres. Notre souci constant sera de préserver le rendement qui doit, seul, motiver cette transformation microbienne en vue de remplacer, nous l'espérons, la synthèse chimique.

CHAPITRE II

METHODOLOGIE DE LA TRANSFORMATION

1953

1953

II - METHODOLOGIE DE LA TRANSFORMATION

A la suite du choix établi à partir de la bibliographie existante, nous avons tenté de reproduire les conditions de bioconversion de l'Ellipticine avant l'amélioration éventuelle de cette technique. Cependant, ce procédé observé de façon globale nous posait de nombreux problèmes. Il fallait, en effet, s'attacher à résoudre diverses difficultés rencontrées couramment dans tout processus biologique. Si la "réaction biologique" proprement dite est simple et facile à mettre en œuvre, en revanche, tous les éléments intervenant en amont et en aval de cette réaction sont beaucoup plus difficiles à maîtriser.

II.1 - PROBLEMATIQUE POSEE PAR NOTRE CHOIX

Cette problématique peut être détaillée selon les points suivants :

1° - *Choix des souches*

Les souches utilisées lors des procédés industriels doivent être sélectionnées afin d'obtenir un rendement maximal. Il nous faut donc choisir des souches susceptibles de correspondre, d'après la littérature, à une possibilité de transformation d'un alcaloïde indolique. Ainsi, au cours de notre recherche bibliographique, avons-nous retenu deux souches largement mentionnées pour la conversion de l'Ellipticine en un dérivé 9-hydroxylé [83,88,98] : *Aspergillus alliaceus* et *Cunninghamella echinulata*.

2° - *Cultures et fermentations*

Il est important, pour une production de biomasse, de fournir le milieu de culture le plus adapté et le moins coûteux. Aussi est-il nécessaire de démarrer des cultures de champignons filamenteux en milieu liquide dans des erlenmeyers avant d'envisager la solution de production en fermenteurs.

3° - *Incorporation de l'Ellipticine*

Afin de procéder à la transformation de l'Ellipticine par la souche choisie, il faut d'abord solubiliser la substance, fortement hydrophobe, au sein du milieu de culture contenant le champignon de façon à ce que l'alcaloïde à transformer puisse être au contact du système fongique. Il faudra donc utiliser un solvant organique pour dissoudre l'Ellipticine tout en évitant une toxicité éventuelle vis-à-vis du microorganisme. Il faut vérifier que l'Ellipticine ne précipite pas en milieu aqueux.

4° - Extraction des composés formés

L'obtention d'un dérivé hydroxylé de l'Ellipticine, converti par le système enzymatique du cytochrome P-450 enchassé dans la membrane du réticulum endoplasmique, nécessite deux étapes distinctes.

Premièrement, il faut traiter la biomasse microbienne de façon à dilacérer toutes les structures cellulaires. En effet, la production du dérivé est endocellulaire et un broyage permet d'extraire le produit transformé.

Deuxièmement, à partir du broyat obtenu, on doit procéder à l'extraction des dérivés hydrophobes formés à partir de l'Ellipticine. Il faut donc trouver un solvant organique adéquat qui permette le transfert des dérivés formés de la phase aqueuse vers la phase organique. On devra s'assurer de l'innocuité de ce solvant.

5° - Analyse des dérivés obtenus

A l'issue des expérimentations, il sera nécessaire de déterminer la qualité et la quantité des dérivés que nous avons réussi à convertir par le système fongique. Ces analyses devront être à la fois rapides et reproductibles, et permettre la séparation puis la purification immédiate des composés intéressants.

II.2 - SOUCHES FONGIQUES UTILISEES

Les champignons filamenteux cultivés en milieu liquide sont utilisés dans plusieurs procédés industriels variés tels que production d'antibiotiques, production d'enzymes ou d'acides organiques, conversion de molécules.

II.2.1 - CARACTERES FONDAMENTAUX DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

II.2.1.1 - Généralités

Ce sont des microorganismes eucaryotes aérobies incapables de photosynthèse qui trouvent leur énergie dans l'oxydation de composés organiques. Certains vivent en saprophytes aux dépens de la matière organique en décomposition et d'autres parasitent les plantes, les animaux ou même l'homme. Ces microorganismes doivent trouver dans le milieu environnant (naturel ou de culture) les éléments nécessaires à leur croissance et à leur multiplication :

- une source énergétique apportée le plus souvent par la dégradation de la matière organique,
- des aliments constitutifs fournissant les éléments nécessaires à la synthèse des constituants cellulaires (eau, oxygène, carbone, azote, phosphore, soufre, éléments minéraux),
- des aliments spécifiques pour les microorganismes ne pouvant synthétiser un ou plusieurs métabolites. Ces substances sont les facteurs de croissance (acides aminés, bases, vitamines).

II.2.1.2 - Morphologie

Ces champignons sont caractérisés par une structure mycélienne. Leur appareil végétatif se présente sous forme de filaments : les hyphes, qui constituent le mycélium ou thalle. Ces hyphes sont cloisonnées ou non par des septa et forment un mycélium simple, complexe ou fortement ramifié, dont les dimensions varient selon les espèces et les milieux de culture. Chaque septum possède un pore central par lequel tous les constituants cellulaires se meuvent librement. Le noyau est entouré d'une membrane nucléaire et contient plusieurs chromosomes. Les cellules peuvent être multinucléées. La paroi cellulaire est essentiellement constituée de glucane, de chitine et de protéines.

II.2.1.3 - Croissance et reproduction

Les champignons filamenteux poussent différemment en cultures liquides submergées ou en milieu solide.

Sur une surface bidimensionnelle comme une gélose en boîte de Pétri, la croissance végétative démarre par germination de spores. Celles-ci sont libérées des appareils sporifères et disséminées. Puis la spore germe en 12 à 24 heures, ce qui demande une synthèse *de novo* de nombreux composés cellulaires. Les champignons croissent typiquement par extension apicale de l'hyphes de manière radiale en direction de l'augmentation du gradient de concentration du milieu nutritif. Le taux de croissance est linéaire et dépend de la largeur de la zone périphérique de croissance, là où la croissance des hyphes est exponentielle et approximativement égale au taux spécifique de croissance observé dans les cultures liquides [118].

La phase de reproduction arrive souvent après la phase de croissance végétative rapide. Il peut exister deux types de reproduction :

- des spores asexuées portées à l'extrémité des hyphes. Elles peuvent être endogènes ou exogènes et sont produites par division mitotique,
- des spores sexuées produites par division méiotique suivie d'une ou plusieurs divisions mitotiques permettant la formation de spores haploïdes.

La Figure II.1 présente le schéma simplifié des cycles possibles des champignons. Ce schéma semble d'ailleurs, aujourd'hui, remis en question.

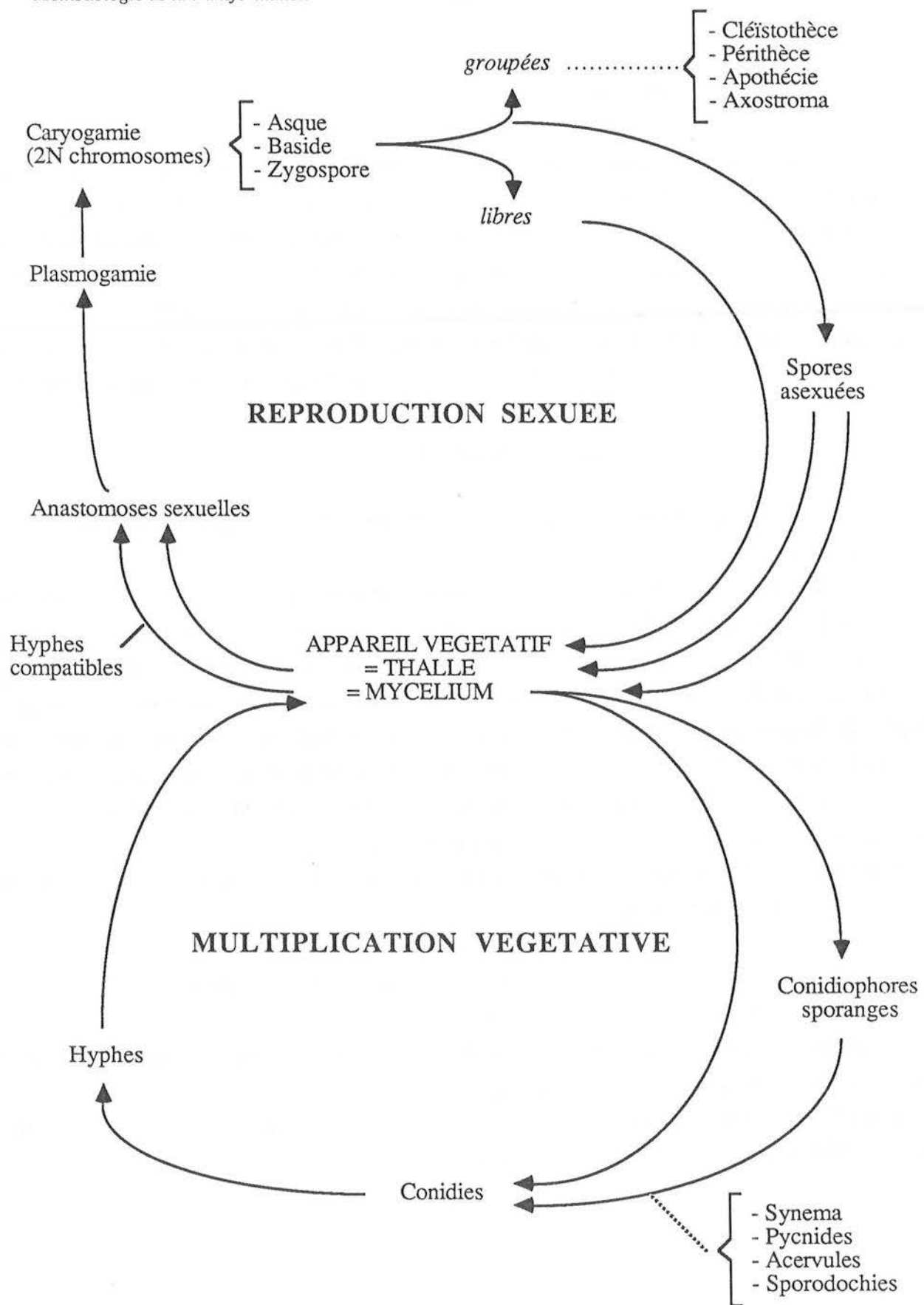


FIGURE II.1 : SCHEMA DES CYCLES POSSIBLES DES CHAMPIGNONS.

Dans un erlenmeyer contenant un milieu nutritif liquide, la croissance s'effectue par allongement des hyphes. De même dans un fermenteur, la multiplication des champignons s'effectue par fragmentation mycélienne mais les hyphes s'enroulent et forment des pelotes nommées "pellets" sur lesquelles prévaut une croissance apicale des hyphes situées à la périphérie de la pelote. Les cultures en milieu liquide submergées ne permettent pas l'obtention de spores.

II.2.1.4 - Classification

D'après le mycélium, les modes de formation des spores asexuées, l'existence et les modalités de la reproduction sexuée, on distingue quatre grandes catégories de champignons filamenteux, au sein du phylum EUMYCOTA :

- Classe I : Les ZYGOMYCETES
- Classe II : Les ASCOMYCETES
- Classe III : Les BASIDIOMYCETES
- Classe IV : Les DEUTEROMYCETES

Certaines classifications ajoutent une cinquième classe constituée par les ENDOMYCETES qui représentent en fait les levures. Le Tableau II.1 présente les différentes caractéristiques respectives des quatre classes de champignons définies ci-dessus.

II.2.2 - LA SOUCHE *ASPERGILLUS ALLIACEUS*

Nous avons utilisé la souche *Aspergillus alliaceus* (CBS 536.65) qui provient de la collection de Baarn aux Pays-Bas. Nous avons eu l'assurance de la similarité de la souche par rapport aux souches répertoriées dans les collections de l'ATCC et de la NRRL.

II.2.2.1 - Classification

Le genre *Aspergillus* fait partie de la classe des Deutéromycètes ou *Fungi Imperfecti*. On désigne sous ce nom l'ensemble des champignons qui ne présentent pas de fructifications sexuées, mais se reproduisent uniquement par voie végétative, au moyen de spores asexuées (conidies) ou par simple fragmentation du mycélium. De nombreuses espèces parasites et la plupart des moisissures banales appartiennent à ce groupe ; leur rôle dans les processus naturels, biologiques et biochimiques, autant que leur importance numérique - le tiers des champignons actuellement connus, soit plus de quinze mille espèces - justifient l'intérêt que leur portent bon nombre de chercheurs et d'industriels.

CLASSES	<i>Champignons primitifs</i>	<i>Champignons supérieurs</i>		
	ZYGOMYCETES	ASCOMYCETES	BASIDIOMYCETES	Champignons imparfaits ou DEUTEROMYCETES
STRUCTURE VEGETATIVE	- Parfois, pas de mycélium - Mycélium non cloisonné	Mycélium régulièrement cloisonné		
REPRODUCTION SEXUEE	Zygospores (union de deux gamétanges égaux)	- 4 à 8 Ascospores à l'intérieur d'asques - Asque dans des formations variables - Spores libérées par rupture de l'asque	4 basidiospores portées sur des basidies, projetées brutalement par un mécanisme particulier	Inconnue ou chez les Ascomycètes ou chez les Basidiomycètes
REPRODUCTION ASEXUEE CONSTANTE	Spores asexuées endogènes dans des sporanges ou sporanges modifiés	Spores asexuées exogènes variées : Conidies en liberté à l'extrémité des conidiophores	Spores asexuées peu fréquentes : conidies	- Mycélium stérile - Conidies exogènes formées par différenciation blastique ou thallique. - Conidies dans des acervules ou pycnides
EXEMPLES	<i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i>	<i>Claviceps</i> <i>Nectria</i>	<i>Puccinia</i> <i>Armillaria</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Pénicillium</i>

TABLEAU II.1 : CLASSIFICATION DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX.

Il est à noter que les espèces de Deutéromycètes appartenant au genre *Aspergillus* ne sont en fait que les formes de multiplication végétative d'Ascomycètes des genres *Sartorya* et *Eurotium* par exemple. Notre souche fait partie, au sein des Deutéromycètes, de l'ordre des Moniliales, famille des Dematiaceae et comprend environ 180 espèces.

On retrouve ces champignons dans le sol qui constitue un réservoir inépuisable. Ces champignons sont des contaminants communs parfois pathogènes pour l'homme, les animaux et les végétaux. Ils sont susceptibles de produire des métabolites toxiques et peuvent être à l'origine de réactions allergiques.

II.2.2.2 - Morphologie

La description de cette souche sur milieu solide permet son identification par l'étude du mode de formation des spores.

Les colonies sur solution gélosée de Czapek décrites par Thom et Church [119], poussent rapidement, 6 à 7 cm en 10 jours à 25°C, et sont composées d'un feutrage basal blanc compact ainsi que d'un mycélium aérien floconneux d'environ 1 cm d'épaisseur. Ces colonies développent typiquement des conidiophores droits portant des têtes conidiennes radiées ainsi que des sclérotés noirs en zones plus ou moins concentriques (Figure II.2).

Les têtes conidiennes sont radiées et divisées en colonnes d'âge divergentes et compactes d'abord jaune-orangé clair, devenant brun-doré de taille variable de 100 à 1000 µm de diamètre. Les têtes les plus petites sont portées sur des conidiophores courts du mycélium aérien alors que les structures les plus grandes se trouvent sur les longs conidiophores des hyphes ayant poussées sur le substrat (Figures II.3A à 3E).

On trouve ensuite les conidiophores, jaunes, sinueux, variant de 0,2 à 3 mm de longueur et de 7,5 à 15 µm de diamètre. Puis on remarque les vésicules de 40 à 70 µm de diamètre portant les stérigmates bisériés. Les conidies apparaissent plus ou moins lisses, jaunes, mesurant environ 3 µm de diamètre (Figures II.4A et 4B).

Les sclérotés noirs, formés de tissu sclérenchymateux, s'érigent, sessiles ou portés sur une suggestion de tige mesurant 2 à 3 mm en axe vertical et de 500 à 700 µm de diamètre, d'abord blanc, ensuite gris-noir puis noir avec l'âge.

L'identification de cette souche est aisée en culture gélosée sur boîte de Pétri. On peut cependant noter qu'il a été décrit des formes sexuées de ce champignon. A côté de la forme anamorphe (Deutéromycètes) et théléomorphe (Ascomycètes), on rencontre une forme holomorphe, mélange des deux formes décrites. Cela signifie que sur cette culture, multiplication végétative et reproduction sexuée peuvent se développer simultanément.

En milieu liquide, l'aspect de ce champignon est très différent puisqu'il ne forme pas de spores. Il développe simplement un mycélium submergé abondant.

II.2.3 - LA SOUCHE *CUNNINGHAMELLA ECHINULATA*

Nous avons obtenu de Baarn deux souches de *Cunninghamella echinulata* : CBS 596.68 et CBS 656.85. De même que pour la souche précédente, nous avons reçu l'assurance de la similarité de ces souches avec celles décrites dans la littérature et détenues à l'ATCC et la NRRL.

II.2.3.1 - Classification

Le genre *Cunninghamella* appartient à l'ordre des Mucorales et fait partie de la famille des *Cunninghamellaceae* au sein de la classe des Zygomycètes. Cette classe de champignon présente la particularité de ne pas avoir de mycélium septé (cf. Tableau II.1).

Cunninghamella echinulata est une espèce très cosmopolite prédominante dans les zones chaudes. Cette souche a été isolée de sols cultivés (citronniers, froment, légumes, cannes à sucre...) ou de terrains non cultivés (conifères, steppe, désert...) dans la région méditerranéenne et dans les zones sub-tropicales. Elle a rarement été isolée dans les régions tempérées. La profondeur du sol ou le pH ne semblent avoir qu'une très faible influence sur sa distribution. De même, sa croissance intervient dans une large gamme de température comprise entre 17 et 44°C.

II.2.3.2 - Morphologie

Les colonies de *Cunninghamella echinulata* poussent très rapidement sur milieu solide, le mycélium apparaissant de couleur blanche à grise. A partir du mycélium basal s'érigent des pédicelles terminés par des sporangiophores de forme globulaire ou vésiculaire. De ces vésicules pyriformes surviennent de façon synchrone des conidies qui peuvent être rondes ou ovales, échinulées ou lisses.

Les zygosporos globulaires formées sont de couleur brun-foncée, tuberculées, la plupart du temps hétérothalliques. Les Figures II.5 et II.6 présentent de jeunes sporanges ainsi que l'aspect des conidies rencontrées sur la souche *Cunninghamella echinulata* (CBS 656.85).



FIGURE II.2 : VUE EN MICROSCOPIE OPTIQUE DE SCLEROTES OBTENUS SUR DES CULTURES D'*ASPERGILLUS ALLIACEUS* EN MILIEU SOLIDE.



FIGURE II.3A : TETES CONIDIENNES RADIEES D'*ASPERGILLUS ALLIACEUS* PHOTOGRAPHIEES EN MICROSCOPIE OPTIQUE.

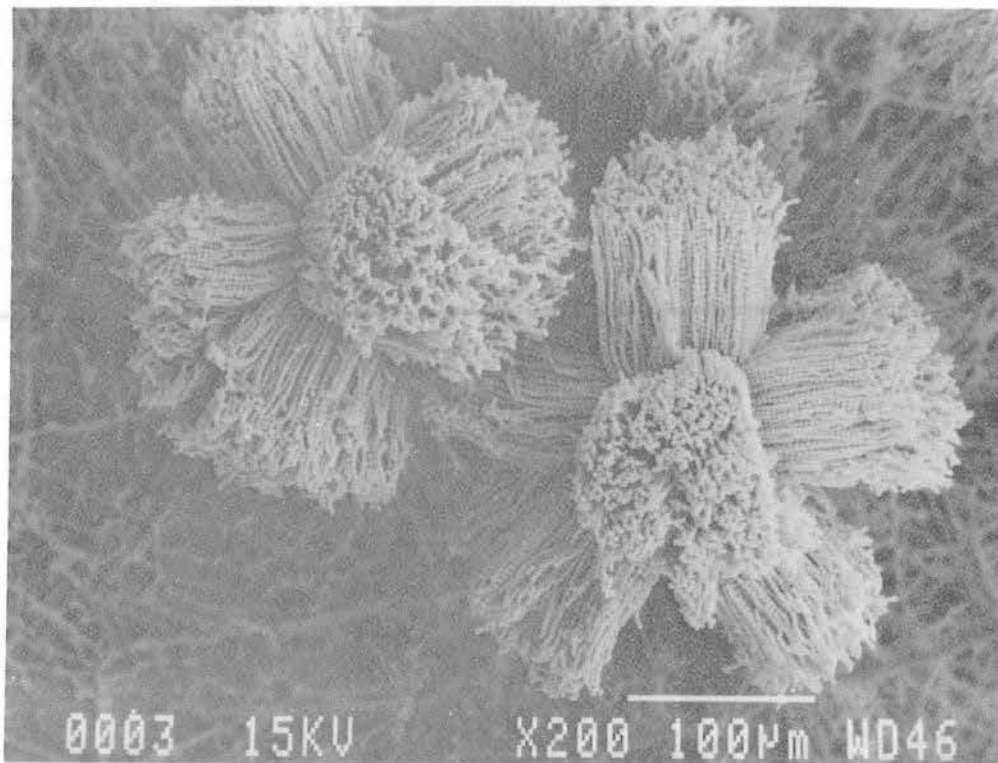
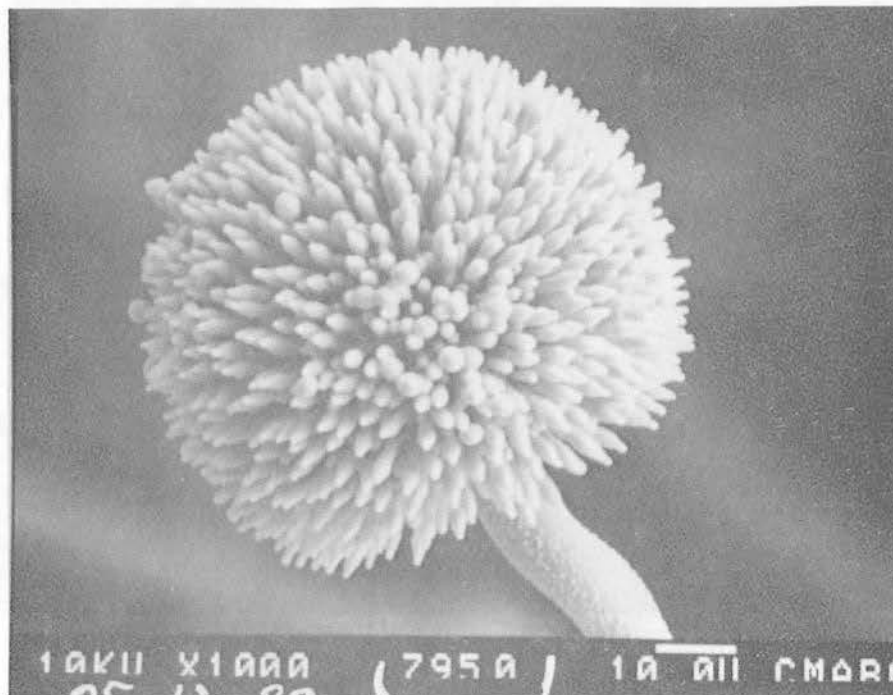


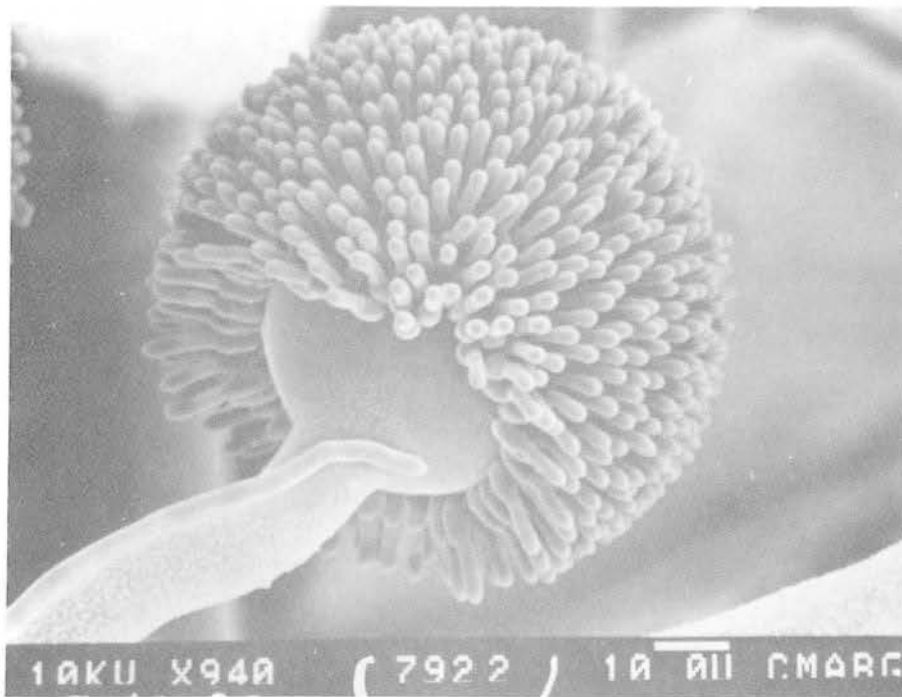
FIGURE II.3B : VUE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'UNE TETE CONIDIENNE RADIEE DE LA MEME SOUCHE.

(Cliché P.Jouffrey, P.Formisyn : C.M.E.S / Ecole des Mines de Saint-Etienne).



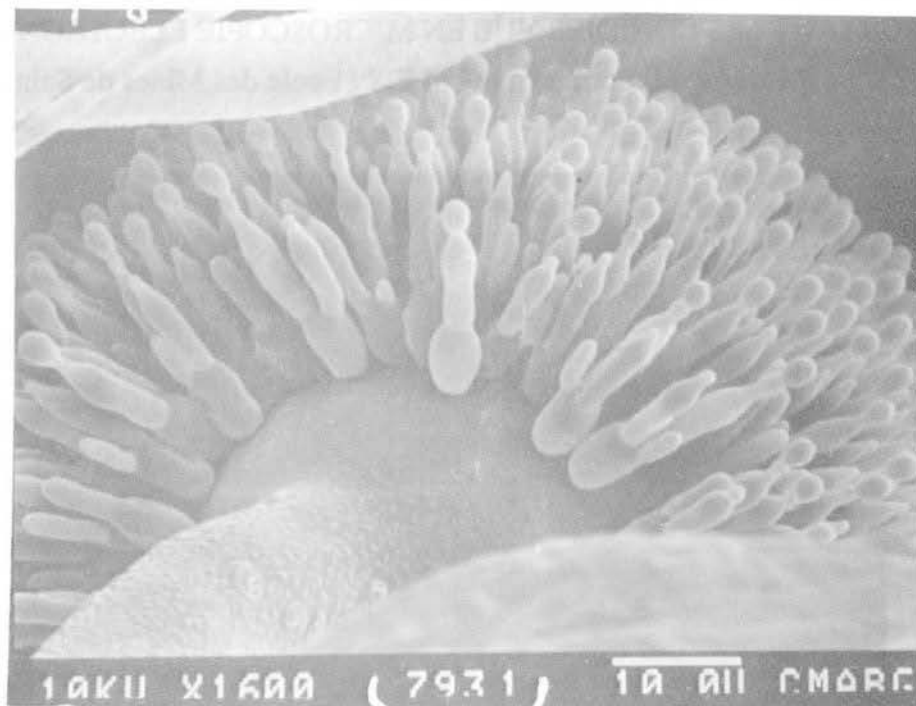
FIGURES II.3C : VUE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'UNE TETE ASPERGILLAIRE EN FORMATION PORTANT DES PHIALIDES.

(Cliché R.Hugheney : C.M.E.A.B.G / Université Lyon I).



3D

3E



FIGURES II.3D et 3E : VUES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'UNE TETE ASPERGILLAIRE EN FORMATION PORTANT DES PHIALIDES.
(Clichés R.Hugheney : C.M.E.A.B.G / Université Lyon I).

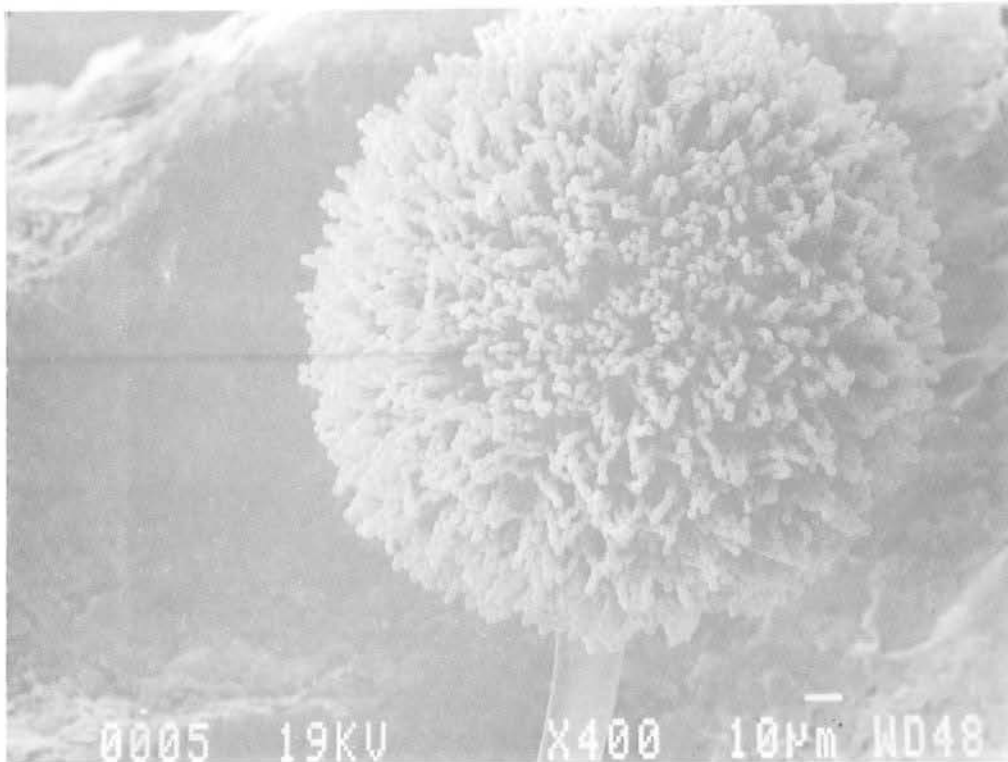


FIGURE II.4A : JEUNE TETE CONIDIENNE D'*ASPERGILLUS ALLIACEUS* PORTANT LES CONIDIES VUE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.
(Cliché P.Jouffrey, P.Formisyn : C.M.E.S / Ecole des Mines de Saint-Etienne).

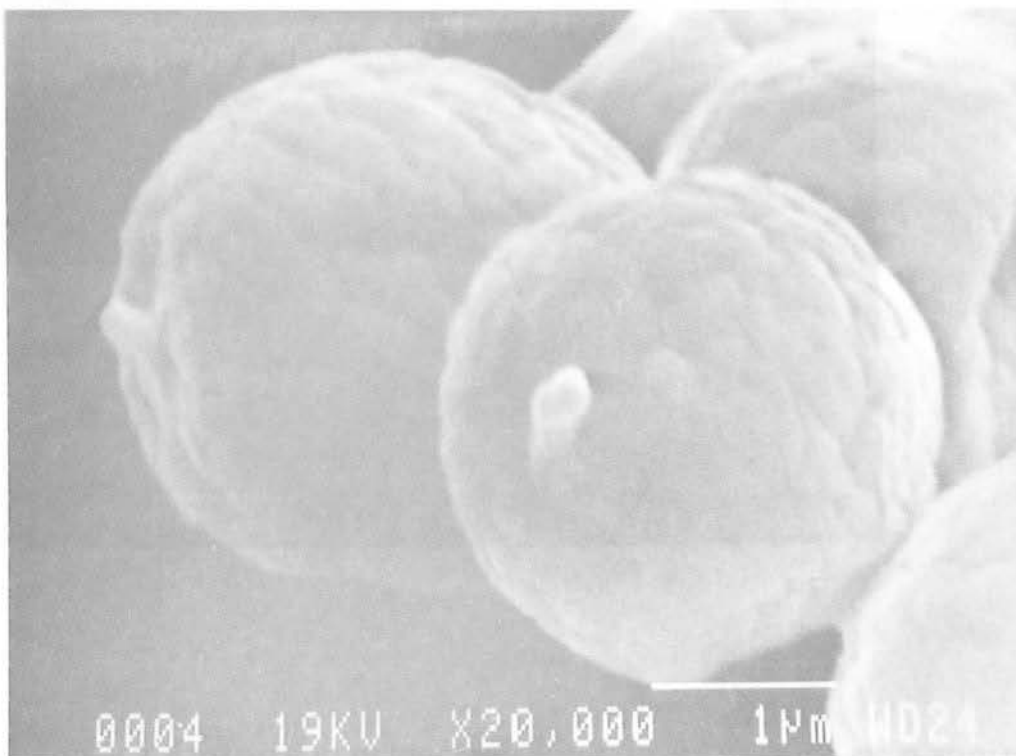
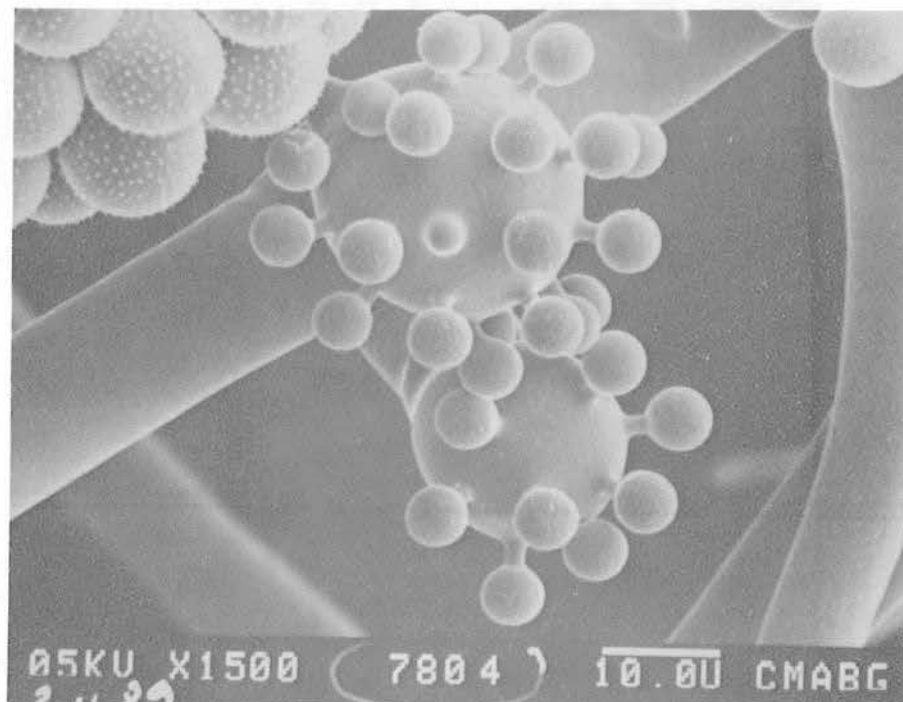
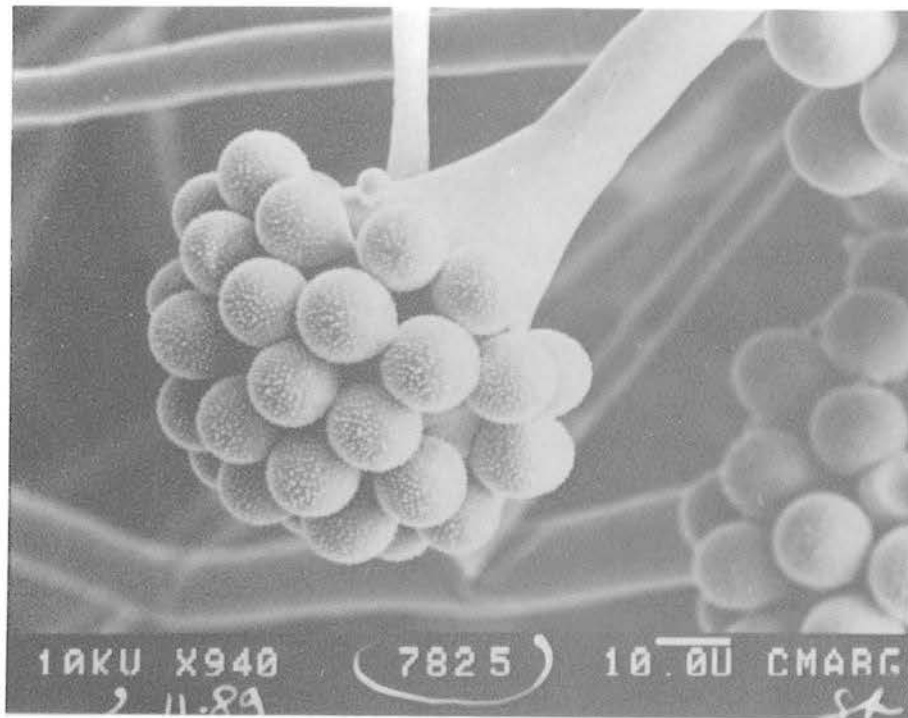


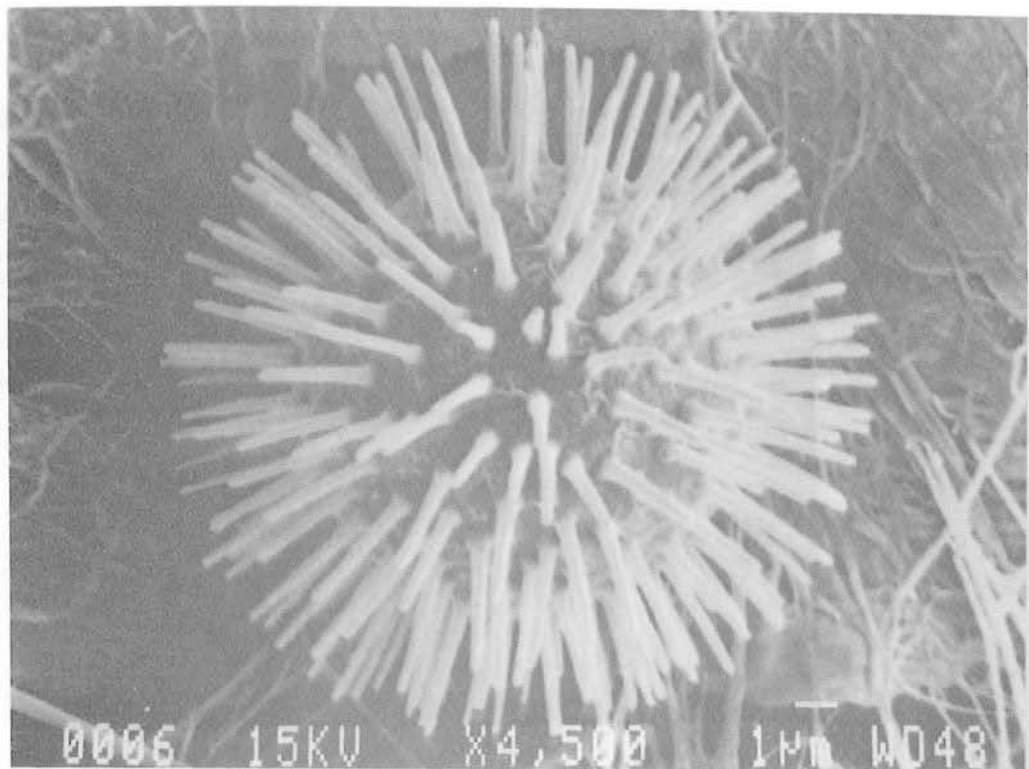
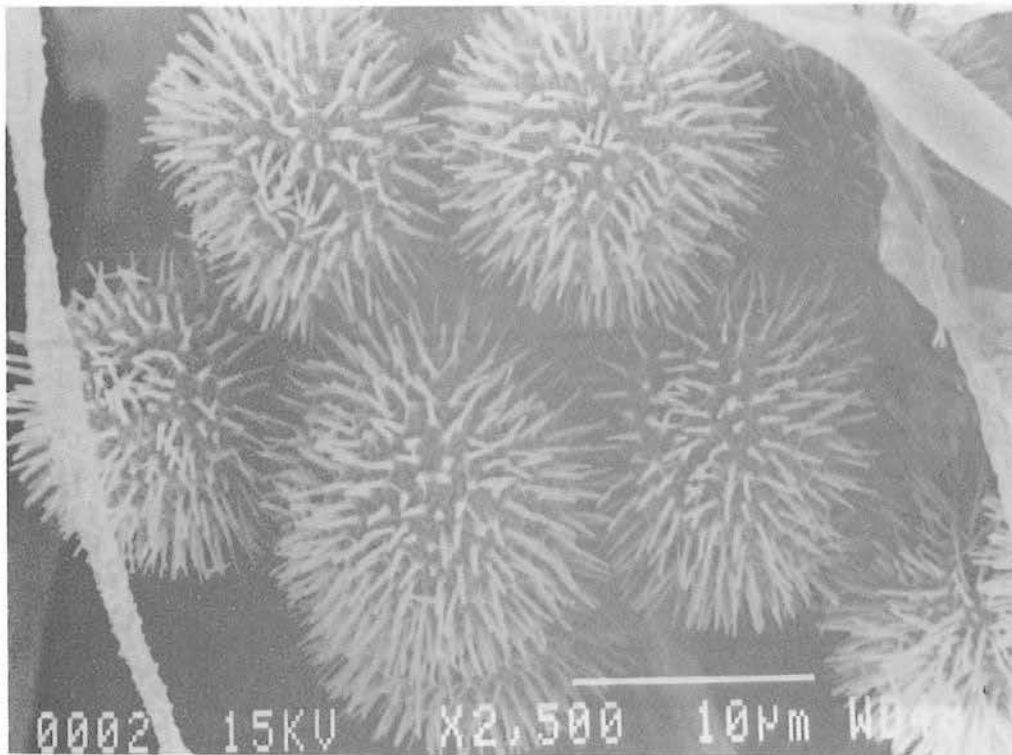
FIGURE II.4B : CONIDIES DE CETTE SOUCHE VUES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.

(Cliché P.Jouffrey, P.Formisyn : C.M.E.S / Ecole des Mines de Saint-Etienne).



FIGURES II.5: VUES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE D'UN SPOROCYSTE EN FORMATION DE LA SOUCHE *CUNNINGHAMELLA ECHINULATA*.

(Clichés R.Hugheney : C.M.E.A.B.G / Université Lyon I).



FIGURES II.6 : VUES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE CONIDIES
DE LA SOUCHE *CUNNINGHAMELLA ECHINULATA*.

(Clichés P.Jouffrey, P.Formisyn : C.M.E.S / Ecole des Mines de Saint-Etienne).

II.3 - CULTURE DES CHAMPIGNONS

Afin de pouvoir évaluer une croissance des champignons filamenteux cultivés en milieu liquide, il nous semble nécessaire de rappeler certains aspects théoriques de notre travail.

II.3.1 - CROISSANCE FONGIQUE

II.3.1.1.- Croissance non limitée : définition et valeur de μ

Lorsqu'un microorganisme est placé dans un environnement non limitant (pour n'avoir qu'une réaction du premier ordre), où l'on a un excès de substrat et des facteurs physico-chimiques favorables (température, pH, pression partielle d'oxygène), l'accroissement en masse ou en nombre de cellules est proportionnel à la quantité d'organismes présents initialement et est caractérisé par deux constantes, le temps de génération (T) et le taux spécifique de croissance (μ).

Le temps de génération est l'intervalle de temps nécessaire au doublement de la population et dans le cas des champignons, cela revient à un doublement de la biomasse.

Soit $T = \frac{t}{n}$ avec t = temps, n = accroissement de la biomasse.

Le taux de croissance μ sera donc la représentation de l'accroissement de la biomasse par unité de temps.

Soit $\mu = \frac{f(N)}{t}$ avec N = population à un temps t donné.

Si l'on a une population initiale N_0 , la croissance augmentera à chaque génération de la façon suivante :

1^{ère} génération : $N_1 = 2 N_0$

2^{ème} génération : $N_2 = 2 \times 2N_0 = 2^2 N_0$

après n générations : $N_n = 2^n N_0$

Exprimée en fonction du taux de croissance, cette équation devient : $N_n = N_0 e^{\mu t}$

Cette équation peut être exprimée sous forme logarithmique :

$$\ln \frac{N_n}{N_0} = \mu t$$

En fermentation, et plus particulièrement lors de l'utilisation de système mycéliens, il est plus aisé d'utiliser la concentration cellulaire X :

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu XV \quad \text{où : } X = \text{concentration cellulaire (g.l}^{-1}\text{) et } V = \text{volume (l)}$$

μ est caractéristique d'une espèce donnée. Cette valeur dépend de l'organisation spatiale des cellules dont dépend la vitesse de synthèse des macromolécules.

On peut donner, à titre d'exemple, quelques valeurs générales. Le taux de croissance spécifique μ pour un champignon filamenteux a une valeur moyenne de $0,17 \text{ h}^{-1}$. Cette valeur de $1/3$ de celle trouvée pour les levures est 8 fois moins élevée que le μ moyen des bactéries. Le temps de doublement de la biomasse, T , est de 4 heures.

Pour la souche *Aspergillus nidulans*, les valeurs moyennes du taux de croissance à différentes températures sont mentionnées dans le Tableau II.2 présenté ci-dessous.

Température	25°C	30°C	37°C
μ	0,148	0,215	0,360

TABLEAU II.2 : VALEURS MOYENNES DE μ OBSERVEES SELON LA TEMPERATURE POUR LA SOUCHE *ASPERGILLUS NIDULANS*.

L'accroissement exponentiel chez un champignon filamenteux est limité à l'allongement des hyphes. Une augmentation exponentielle ne peut avoir lieu que s'il y a ramification. L'augmentation globale se poursuit quand toutes les hyphes croissent linéairement à condition que les ramifications se fassent proportionnellement à la longueur totale des hyphes.

II.3.1.2- Consommation du substrat - Rendement et maintenance

La croissance cellulaire se fait au détriment de divers substrats. Par rapport à chacun des substrats, un rendement massique de production de microorganismes peut être défini par :

$$R_{X/A} = \frac{-d(XV)}{d(AV)}$$

avec $R_{X/A}$ = rendement de production de microorganismes par consommation de substrat A.

X = concentration cellulaire exprimée en g.l^{-1} .

A = concentration en substrat A exprimée en g.l^{-1} .

V = volume en litres.

Un rendement peut être défini pour chaque matière première de la réaction de fermentation, comme la source de carbone, l'azote ou l'oxygène.

Quand le milieu ne contient plus de substrat, il n'y a plus de croissance cellulaire. Les microorganismes et notamment les champignons consomment le substrat pour une enzyme de maintenance qui est nécessaire à l'entretien des macromolécules ainsi qu'aux mouvements (d'ions et de solutés). Le rendement R peut être formulé par :

$$R = \frac{dS}{dt} = \left(\frac{1}{Y_c} \cdot \frac{dx}{dt} \right) - \left[\left(\frac{1}{Y_p} \cdot \frac{dp}{dt} \right) + (m) \right]$$

avec S = substrat

$\frac{dx}{dt}$ = accroissement de biomasse; Y_c = taux de conversion limite en biomasse

$\frac{dp}{dt}$ = production de métabolites; Y_p = taux de conversion limite en métabolites

m = maintenance en g. g⁻¹ de matière sèche. h⁻¹

On conçoit que le rendement en biomasse, R, est diminué quand la production de métabolite ou bien la maintenance sont importants.

R prend sa valeur maximale lorsqu'il n'y a pratiquement que formation de biomasse. On l'observe dans les cas où il n'y a pas de production de métabolites et lorsque m est très faible. Donc R est d'autant plus grand que m est petit et que μ tend vers sa valeur maximale μ_{max} .

Quand le taux de croissance μ diminue, l'importance relative de m augmente. En effet, les champignons qui ont un μ faible ont une part importante du substrat qui va servir à l'énergie de maintenance. Par exemple, *Penicillium chrysogenum* a un taux de maintenance m égal à 10 % de consommation du substrat à μ_{max} , et à 70 % de consommation du substrat à $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ où ce champignon produit la pénicilline.

II.3.1.3 - Culture en "batch"

La croissance d'un inoculum est suivie jusqu'à épuisement du milieu dans des conditions extérieures de température maintenues constantes et favorables au développement du microorganisme. Cette étude consiste à suivre en fonction du temps (t) l'évolution de X qui est la concentration en biomasse microbienne (gramme de matière sèche cellulaire par unité de volume de culture). Ce phénomène se déroule en plusieurs phases comme l'indique la Figure II.7.

phase I : C'est la phase de latence qui suit l'ensemencement du champignon dans le milieu de culture. Bien que les interprétations de sa présence ne soient pas encore bien établies, on pense qu'il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la cellule synthétise les enzymes

nécessaires à métaboliser le substrat présent. Sa durée varie avec la taille de l'inoculum, l'âge et l'état biochimique des cellules qu'il renferme. Lorsque le fermenteur est inoculé avec des spores, cette étape dure environ 12 heures.

phase 2 : C'est la phase de départ : la reproduction cellulaire débute. La concentration en biomasse et le taux de croissance ($\frac{dX}{dt} = \mu X$) augmentent peu à peu.

phase 3 : C'est la phase exponentielle de croissance au cours de laquelle le taux de croissance cellulaire atteint son maximum : μ maximum. Tout au long de cette phase logarithmique, le temps de doublement de la population (temps de génération = T) prend sa valeur minimale. Cette valeur varie d'un microorganisme à un autre, et pour un microorganisme en fonction des conditions (milieu de culture, température, oxygène...). Elle est généralement comprise entre 1,5 et 6 heures. Au cours de cette phase, la vitesse de croissance dX/dt augmente. Il est cependant difficile d'observer une croissance exponentielle de plus de cinq doublements.

L'équation de X en fonction du temps s'exprime par : $X = X_0 e^{\mu_{\max} \cdot t}$.

Lors de la phase exponentielle, le taux de croissance est indépendant de la concentration des divers composés du milieu de culture. Cependant, ceci n'est vrai qu'au-dessus d'un certain seuil de concentration. Si un des composés est apporté en faible quantité, μ demeure inférieur à μ_{\max} . Ce phénomène a été étudié par Monod. Il a proposé une loi, extrapolée de la loi de Michaelis-Menten, qui permet d'exprimer μ en fonction de S (concentration en substrat) par la relation suivante :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot [S]}{K[S] + [S]}$$

où $K[S]$ représente la concentration pour laquelle le taux de croissance prend la moitié de sa valeur maximale. Cette loi est appelée loi de Monod.

Phase 4 : C'est la phase de ralentissement qui correspond à l'épuisement du milieu de culture en un ou plusieurs composés nécessaires à la croissance, et parfois à l'accumulation de produits inhibiteurs résultant du métabolisme microbien. Le taux de croissance diminue alors, ce qui peut-être expliqué par la relation de Monod.

En effet, la Figure II.8 montre que tant que S reste grand, le taux de croissance peut être considéré comme constant, égal à μ_{\max} , et la culture se trouve en phase exponentielle de croissance (2). Mais dès que S devient inférieur à S' (concentration en substrat limitant) la diminution rapide du taux de croissance ne permet plus d'évoquer une croissance exponentielle et fait passer le "batch" en phase d'arrêt (3). Il est évident que ce sera le premier substrat en voie d'épuisement (source de carbone, source d'azote ou oligoélément) qui créera l'arrêt de la croissance.

Phase 5 : C'est la phase stationnaire pour laquelle X atteint sa valeur maximale. La croissance s'arrête ce qui entraîne des modifications de la structure biochimique de la cellule qui conserve une activité métabolique.

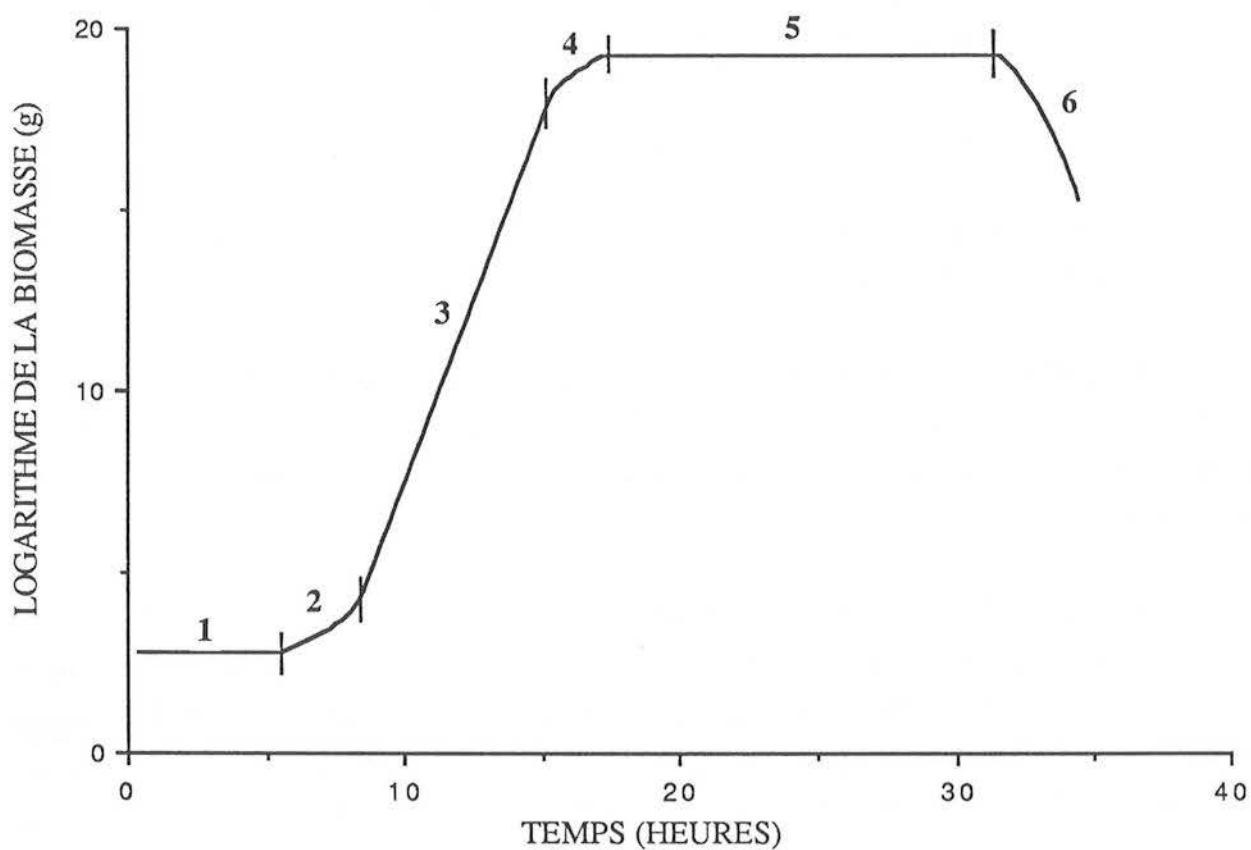
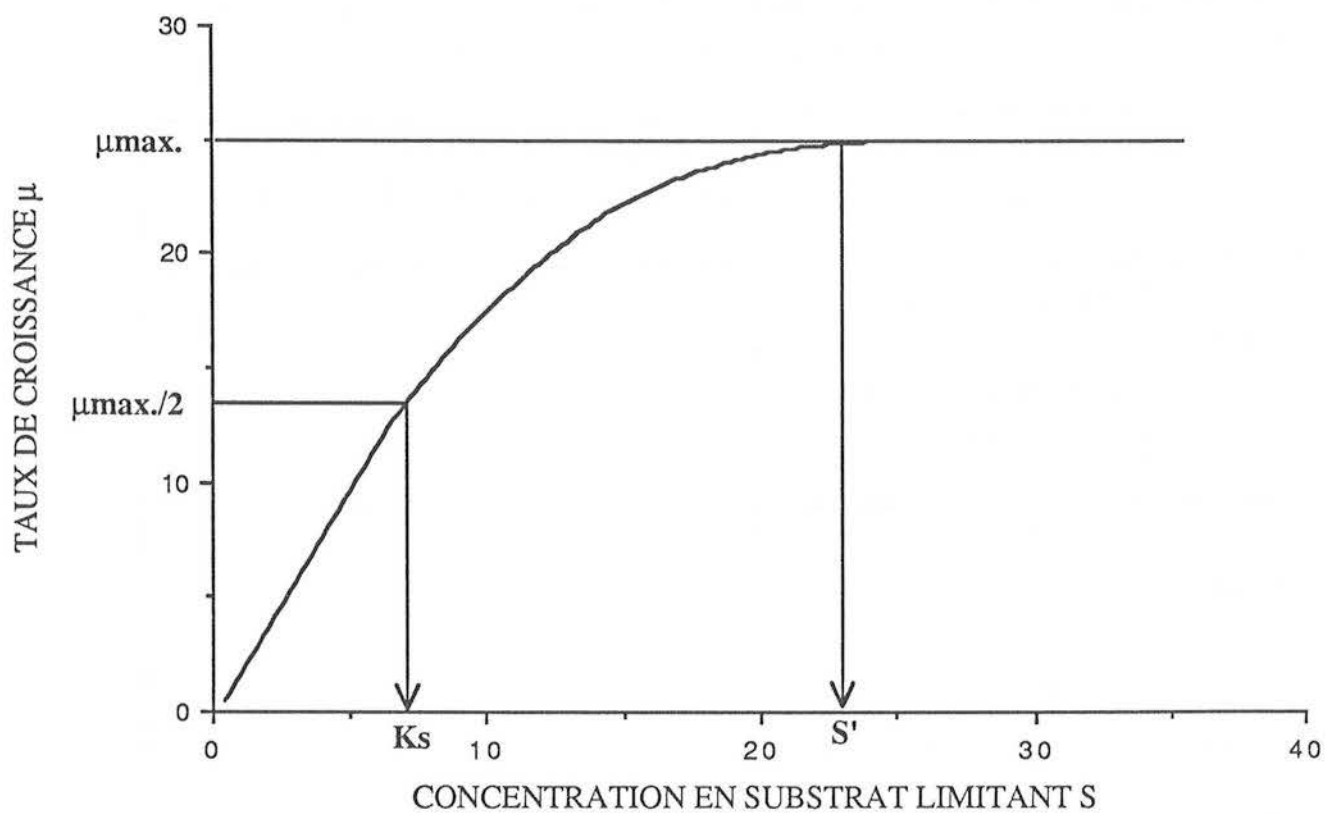


FIGURE II.7 : COURBE DE CROISSANCE TYPE.

FIGURE II.8 : $\mu = f(S)$.

Phase 6 : C'est la phase de déclin au cours de laquelle la biomasse décroît par suite de l'autolyse sous l'action des enzymes cellulaires.

II.3.1.4 - Limitation cinétique de la croissance

Le procédé d'échange de matériel entre la surface d'un microorganisme et son environnement externe est un procédé de transfert de masse.

Dans des systèmes de fermentation conventionnelle, la demande microbienne pour des substrats autre que l'oxygène ne rencontre pas habituellement de gros problèmes puisque ces composés sont en large excès et dissous dans le milieu liquide. Les microorganismes sont ainsi forcés d'accroître leur activité métabolique.

En revanche, dans un milieu liquide aqueux, le taux d'oxygène dissous est approximativement de l'ordre de $9 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$ à 20°C à la pression atmosphérique ambiante. La diminution de l'oxygène dans le milieu liquide est extrêmement rapide lors d'un début de croissance microbienne. Pour cette raison, l'apport en oxygène quand le procédé est aérobie devient le facteur crucial qui détermine le taux de croissance. Cela est dû à la faible solubilité de l'oxygène dans les milieux aqueux.

C'est pourquoi le transfert d'oxygène dissous domine le concept de transfert de matières dans les fermentations industrielles. Le Tableau II.3 donne les valeurs indicatives de la demande spécifique en oxygène de quelques champignons et pour deux procédés.

Systèmes	Microorganismes ou Produits	Demande spécifique en oxygène (exprimée en mM d'O ₂ g ⁻¹ de cellules h ⁻¹)
a) Organismes	<i>Aspergillus niger</i>	3,0
	<i>Streptomyces griseus</i>	3,0
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	3,9
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8,0
b) Fermentation	Streptomycine	4,2
	Oxytétracycline	7,4
	Pénicilline	2,0
	Levure	2,7

TABLEAU II.3 : DEMANDE SPECIFIQUE MAXIMALE EN OXYGENE SELON

a) BROWN;1970 [120] ET b) GADEN;1961 [121].

La mise en œuvre d'une fermentation avec un taux très élevé d'oxygène n'est pas la solution à ce problème pour des raisons économiques et physiologiques. En effet, divers procédés sont moins efficaces avec de fortes aérations. De plus, une aération trop forte provoque une fluidification du milieu ("flooding") et diminue l'efficacité du procédé. L'oxygène en trop forte proportion est toxique pour les microorganismes.

Tout cela nécessite donc l'étude et le calcul du niveau nécessaire et suffisant d'oxygène dans un procédé de fermentation.

II.3.1.4.1 - Problème général et mécanismes de base du transfert de masse

Dans un milieu de fermentation hétérogène non newtonien comme peut l'être une culture fongique, il y aura des résistances de transfert d'un composé chimique de la phase d'approvisionnement à la phase réceptrice. La Figure II.9 représente schématiquement un système général concernant les gaz, la phase liquide et la phase solide.

On peut résumer les sites de résistances exercés sur les transferts de masse :

- au sein du volume de gaz
- dans le film gazeux
- à l'interface gaz/liquide
- dans le film liquide
- au sein du volume de liquide
- dans le film liquide entourant la phase solide
- à l'interface liquide/solide
- dans la phase solide.

II.3.1.4.2 - Diffusion moléculaire

Les transferts de matériel contribuent à rendre les concentrations uniformes. Cette diffusion est déterminée par les mouvements thermiques des molécules et il en résulte un transfert des régions les plus concentrées vers les régions les moins concentrées. Le flux net de diffusion par unité de surface, J , est égal à :

$$J = -D \frac{dC_x}{dx}$$

avec : D = coefficient de diffusion de la solution

dC_x/dx = gradient de concentration de x à un temps t donné.

Habituellement, on suppose que le coefficient de diffusion est indépendant de la concentration.

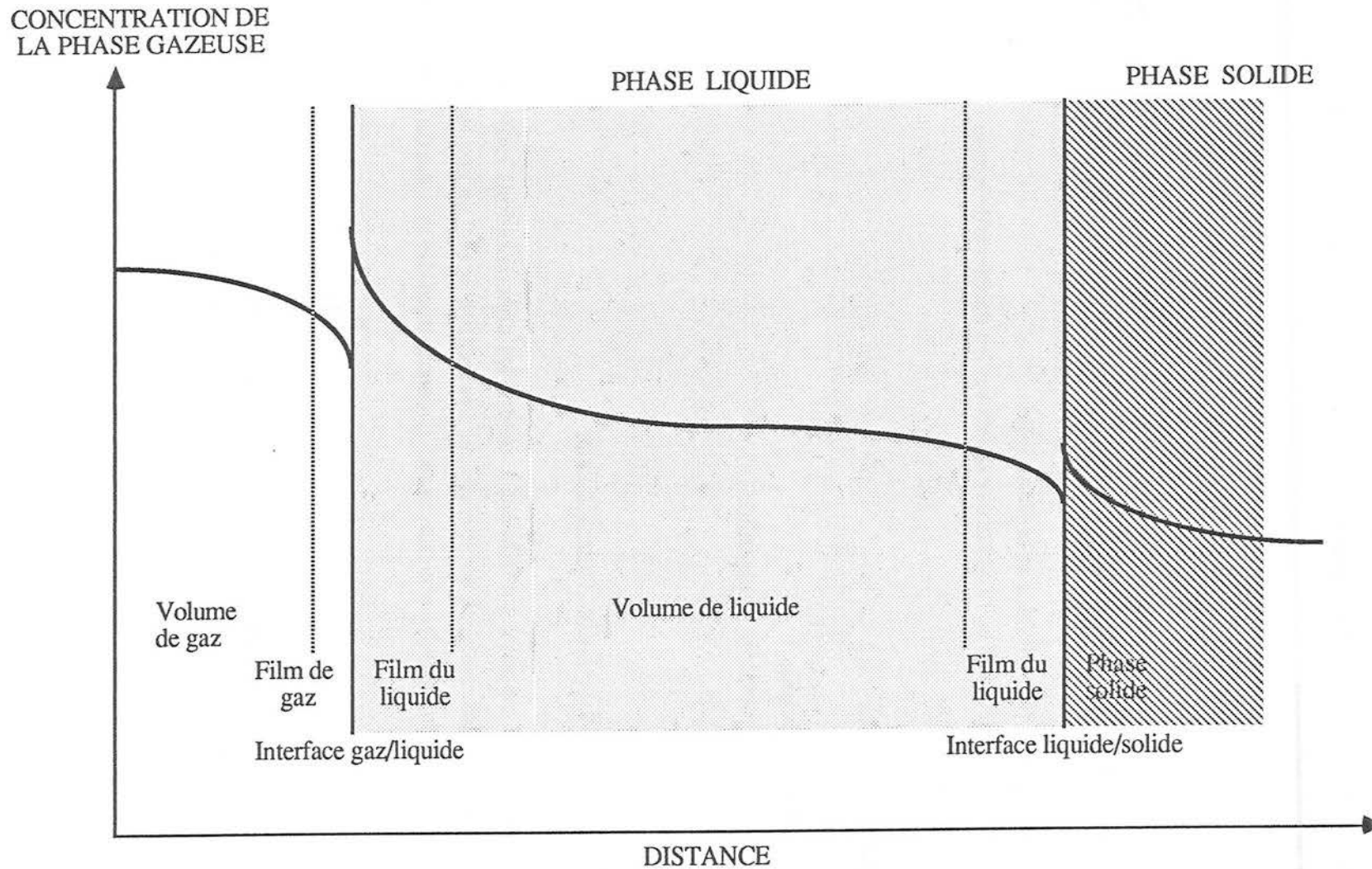


FIGURE II.9 : SCHEMA CLASSIQUE DES RESISTANCES DES TRANSFERTS DE MASSE DANS UN SYSTEME CONTENANT UN GAZ AINSI QU'UNE PHASE LIQUIDE ET UNE PHASE SOLIDE.

Le concept de coefficient de transferts de matières devient particulièrement usité dans les études à travers des phases liées. La Figure II.10 montre qu'il y a un gradient de concentration par diffusion dans chaque phase. Les concentrations C_x et C_y ne sont pas équilibrées sinon il n'y aurait pas de diffusion.

Les équilibres de concentrations correspondent également aux potentiels chimiques des composants diffusant dans chacune des deux phases de l'interface.

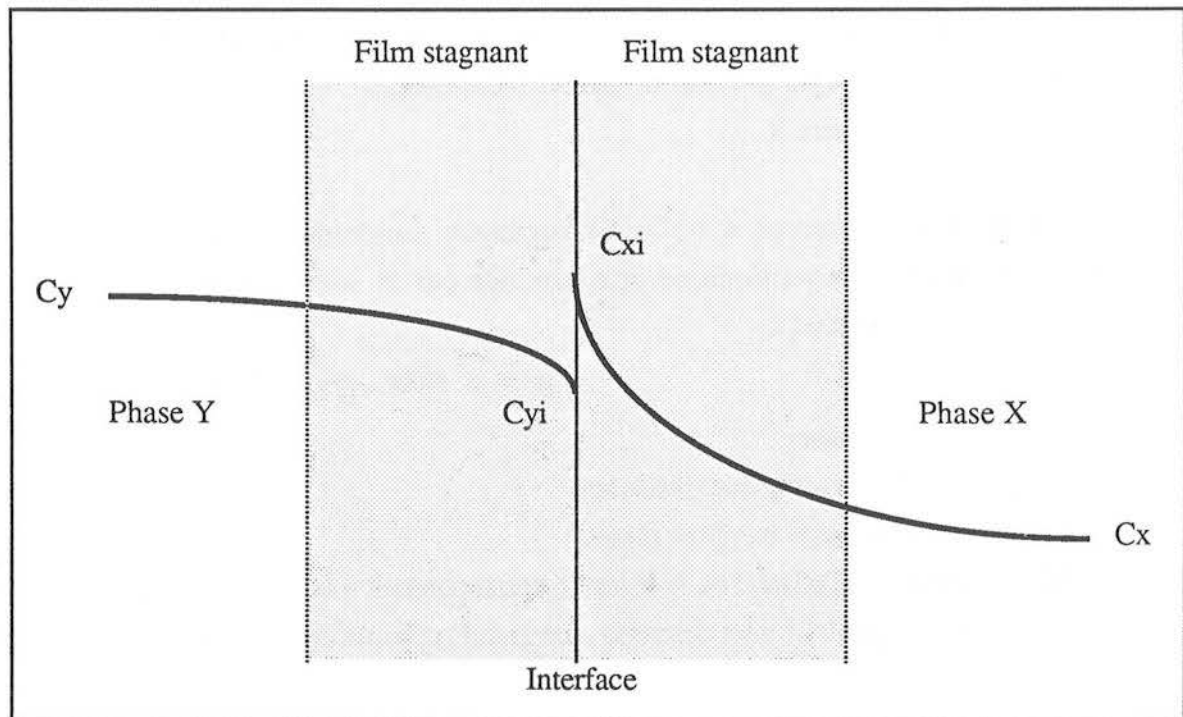


FIGURE II.10 : TRANSFERT DE MASSE A TRAVERS DEUX PHASES LIEES.

II.3.1.4.3 - Transferts gazeux

Ces transferts sont surtout affectés par la solubilité des composants gazeux dans les liquides. Malheureusement, l'oxygène est très peu soluble dans les solutions aqueuses. Ce facteur couplé à l'importance de l'oxygène pour le métabolisme microbien justifie la quantité d'efforts déployés pour l'étude du transfert d'oxygène dans les fermentations.

a) Rôles de l'oxygène

L'oxygène joue d'abord un rôle essentiel dans le métabolisme aérobie producteur d'énergie comme accepteur final des électrons et des protons produits par les réactions d'oxydation.

L'oxygène intervient ensuite dans certains mécanismes de régulation du métabolisme de façon directe, comme inducteur ou répresseur de la synthèse d'enzymes respiratoires, mais aussi de façon indirecte du fait de son rôle dans le métabolisme énergétique.

Lorsque la croissance microbienne se fait sur un substrat moins oxydé que la biomasse, ce qui est le cas des substrats glucidiques et *a fortiori* des hydrocarbures, l'oxygène joue le rôle de substrat : il sert alors à l'édification des constituants cellulaires.

Le besoin en oxygène est défini par deux éléments :

- le coefficient QO_2 qui désigne la quantité d'oxygène consommé exprimée en volume, masse ou moles par unité de temps et par unité de biomasse microbienne,
- la concentration cellulaire X .

La demande en oxygène ($QO_2.X$) augmente rapidement pour atteindre sa valeur maximale en fin de phase logarithmique puis diminue par la suite. Agissant comme substrat, l'oxygène obéit à la loi de Monod :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{O_2}{K_{O_2} + O_2}$$

où μ = taux de croissance

μ_{\max} = taux de croissance maximum

O_2 = concentration en oxygène dissous

K_{O_2} = constante d'affinité de la réaction correspondant à la concentration en oxygène pour laquelle le taux de croissance prend la moitié de la valeur maximale.

b) Modalités du transfert d'oxygène

L'absorption de l'oxygène de l'air dans le champignon est caractérisée par un système de transport de matière multiphasique que l'on peut détailler successivement comme suit :

1. Transport d'oxygène de la bulle d'air à l'interface gaz/liquide.
2. Transfert d'oxygène à travers l'interface gaz/liquide.
3. Transport d'oxygène de l'interface gaz/liquide au liquide.
4. Transport convectif de l'oxygène dans le liquide.
5. Transport de l'oxygène du liquide à la surface des microorganismes, agglomérats cellulaires (champignons), floculats ou pellets par diffusion et convection. Chez les microorganismes eucaryotes, les enzymes respiratoires sont localisées dans la mitochondrie. L'oxygène doit donc diffuser dans le cytoplasme et traverser la paroi mitochondriale.
6. Transport de l'oxygène intra-cellulaire par diffusion.

c) Transfert de l'oxygène

La solubilité d'un gaz dans une phase liquide s'exprime par la loi de Henry :

$$C = H.p$$

avec : H = constante de Henry ($\text{mM d'O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \text{ atm}^{-1}$.)

p = pression partielle du gaz considéré dans la phase gazeuse (exprimée en atm.)

C = concentration molaire du gaz dans la phase liquide ($\text{mM} \cdot \text{l}^{-1}$).

Cette constante de Henry est affectée par la température, la concentration des sels dissous et le pH de la solution. La mesure de l'oxygène dissous nécessitera donc certaines précautions. Nous ne nous étendrons pas sur cette question et nous préciserons simplement que l'oxygène sert à la demande de la culture microbienne.

II.3.2 - PRODUCTION DE BIOMASSE

II.3.2.1 - Différents types de culture

On préfère la culture en milieu liquide à la culture en milieu solide pour trois raisons :

- d'abord une facilité de transfert, de stérilisation et de mélange des milieux de cultures ;
- puis une facilité de transfert des gaz et d'homogénéisation du substrat ;
- enfin, une facilité d'obtention de la biomasse ou du produit de fermentation.

Culture en milieu solide : cette technique a longtemps été utilisée et le reste notamment pour les champignons destinés à la fromagerie.

Il n'y a pas de spores en milieu liquide mais seulement en milieu solide. Le métabolisme est lié à un processus anaérobie, notamment la synthèse.

Culture en milieu liquide :

* DISCONTINUE ou en "batch" : la fermentation se développe à partir de l'introduction d'un milieu neuf stérile et d'un inoculum. Une fois la biomasse ou le produit obtenu, on récupère le mycélium ou le milieu de culture ou les deux puis on recommence un cycle.

* CONTINUE : il n'y a pas d'arrêt de la culture mais un apport permanent de milieu de culture neuf. On effectue en revanche la récupération du milieu de fermentation contenant la biomasse et les métabolites. Le volume de culture est donc constant et l'on peut définir plusieurs valeurs tels le taux de dilution D ou le débit volumique F .

Il existe une fermentation type TURBIDOSTAT où μ est proche de μ_{\max} , et dans lequel la concentration est maintenue par une pompe doseuse alimentant la fermentation en substrat. Cette

pompe est reliée à une cellule photoélectrique mesurant l'absorbance de la suspension et un système appelé chemostat qui est utilisé pour la production de métabolites. On fixe un μ très faible, et très inférieur au μ_{\max} , puis on ajuste D à la valeur de μ donnant la production attendue.

II.3.2.2- Les rendements : valeurs et variations

Le rendement est important notamment vis-à-vis de la source de carbone car c'est souvent le composé le plus cher et il faut donc que le rendement soit maximum. Quand cette source de carbone, le glucose par exemple, est le seul facteur limitant, le rendement R correspond à

$$R = \frac{\text{masse de cellules synthétisées}}{\text{masse de glucose consommé}}$$

Si l'oxygène n'est pas en quantité suffisante, il y a diminution rapide du rendement : une partie du glucose sera alors fermentée (et non respirée), ce qui signifie qu'il y aura consommation de beaucoup plus de sucre pour une même biomasse.

L'aération est un critère des plus importants et quoique l'air soit disponible, l'aération coûte cher et est due à la faible solubilité de l'oxygène de l'air dans l'eau. Il faut plusieurs fois cette quantité pour avoir un volume suffisant et nécessaire à l'assimilation des sucres.

L'utilisation des substrats et l'oxygène dépendent beaucoup de la forme de croissance que l'on observe en milieu liquide agité. De cette forme de croissance dépendra l'approvisionnement entre substrats et oxygène.

II.3.2.3 - Forme des cultures et aspects qualitatifs de la biomasse produite

Trois formes peuvent être rencontrées :

- LES FORMES MYCÉLIENNES : ce sont des formes qui ont une faible viscosité et un excellent transfert de substrat et d'oxygène.

- LES FORMES EN "PELLETS" : ce sont des pelotes dont le diamètre est compris entre 0,1 et 1 μm . Ce sont des suspensions solides. Il y a une bonne diffusion de l'oxygène entre les pelotes mais le transfert est faible dans les pellets (on a un phénomène d'anaérobiose). La croissance est bonne à la surface, mais médiocre à l'intérieur. De plus, l'hétérogénéité dans la production de métabolites est importante.

- LES FORMES FILAMENTEUSES où l'on a une grande viscosité qui implique des mouvements de transferts d'oxygène et de substrat. On peut diminuer la viscosité en augmentant la vitesse de cisaillement puisque la suspension est non-newtonienne.

II.3.3 - BIOCONVERSION DE L'ELLIPTICINE

Nous avons vu dans le chapitre précédent que des essais de transformation de l'Ellipticine par un système fongique avaient déjà été réalisés par quelques auteurs. Nous nous sommes donc naturellement inspirés des modes opératoires décrits pour tenter cette transformation. Aussi, avant de préciser notre protocole, nous détaillerons les systèmes opératoires mentionnés dans la littérature.

II.3.3.1 - Rappel bibliographique

Il existe relativement peu de publications sur la transformation de l'Ellipticine par un champignon filamenteux.

Les premières données sur la conversion possible de l'Ellipticine par un système fongique en un ou plusieurs dérivés remontent à 1975 [96]. La méthodologie employée fait appel à des techniques utilisées couramment pour d'autres systèmes de bioconversion comme par exemple la transformation des stéroïdes. Ainsi, deux schémas sont généralement proposés depuis qu'en 1962 Schleg et Knight ont rapporté la 11 α -hydroxylation de la progestérone par les conidies d'*Aspergillus ochraceus* [122].

Dans la méthode conventionnelle, les cellules végétatives ou les spores servent à inoculer un milieu utilisable en erlenmeyer ou en fermenteur. Le substrat à transformer est ajouté soit à l'inoculum, soit un certain temps après l'inoculation [83,96]. L'Ellipticine est convertie en dérivés hydroxylés ou méthoxylés [94,96,105,123,124].

Dans le procédé utilisant les spores, celles-ci sont produites par sporulation de surface en milieu solide ou en milieu liquide, séparées du mycélium et une fois récupérées mises dans une suspension contenant le substrat [112,122].

Nous avons décidé de nous contenter de travailler sur la première méthode pour deux raisons :

- * avant d'aborder une étude sur la capacité des spores à transformer ou non une substance, il nous paraît important de savoir si un tel procédé fonctionne avec les cellules végétatives. De plus, l'obtention de grosses quantités de mycélium est bien plus aisée [122];

- * ensuite, étant donné la localisation du système des monooxygénases à cytochrome P450, il nous apparaît plus logique de commencer par cette méthode de manière à connaître sa faisabilité et comparer les taux de conversion obtenus par rapport à ceux atteints par le "spore process" pour d'autres substances.

II.3.3.2 - Protocole expérimental

Le protocole expérimental que nous allons définir servira d'une façon générale à tous les essais que nous effectuerons. En effet, nous nous sommes attachés à démontrer une faisabilité industrielle. Cet objectif sous-tend deux éléments : d'une part la vérification au laboratoire d'une transformation fongique de l'Ellipticine en erlenmeyer et, d'autre part, le passage à un réacteur pilote permettant d'évaluer plus précisément la reproductibilité des résultats éventuels obtenus en flacons de culture et leur amélioration par le contrôle plus rigoureux de certains paramètres.

Au cours de cette étude en fermenteur, nous avons eu l'opportunité de travailler sur un réacteur de type pulsé, au laboratoire de Verfahrenstechnik du professeur Brauer à l'Université Technique de Berlin. Ce réacteur utilisé avec succès dans d'autres procédés biologiques, est équipé d'un système d'agitation original que nous avons testé sur notre problème de transformation [125].

II.3.3.2.1 - Milieu de culture

Le milieu de culture que nous avons défini pour notre souche principale de travail, *Aspergillus alliaceus* (CBS 536.65), est calqué sur ce que préconise la littérature pour l'Ellipticine [88,94,96,97].

D'autres substances comme l'acronycine, la pentoxyfilline ou les stéroïdes ont fait l'objet de publications sur la méthodologie de leur conversion [94,100,102]. Le milieu de culture diffère peu et dépend essentiellement de la souche utilisée [122].

De même, l'utilisation de la souche *Beauvaria sulfurescens* pour l'hydroxylation de substances comporte un milieu assez similaire [126,127], ainsi que d'autres hydroxylations microbiennes [99,128].

Le milieu de culture retenu doit permettre la croissance des deux souches utilisées pour notre bioconversion : *Aspergillus alliaceus* et *Cunninghamella echinulata*. Après quelques essais de croissance fongique optimale, nous avons défini un milieu de culture tel que celui mentionné dans le Tableau II.4.

II.3.3.2.2.- Essais de biotransformation

La méthodologie que nous avons employée pour la transformation de l'Ellipticine en un dérivé 9-hydroxylé suit de très près celle rencontrée dans la littérature.

1°/ Essais réalisés en erlenmeyers

Ces essais ont été menés en petites quantités de façon à déterminer précisément des taux de conversion.

Composants	Quantité (g.l ⁻¹)
D (+) Glucose anhydre pur (Prolabo, ref:24 379) :	20
Extrait de soja (Biosoyase BioMérieux, ref: 5 3401) :	5
Extrait de levure (BioMérieux, ref: 5 3121) :	5
NaCl (Stock, ref: 35 120) :	5
KH ₂ PO ₄ (Prolabo, ref: 26 930 293)	5
pH ajusté à 5,6 (à l'aide d'HCl 0,1N) Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. Pénicilline-Streptomycine 50 000 UI (Biomérieux)	2 p.mille

TABLEAU II.4 : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE UTILISE.

a) Préparation des cultures

Les flacons utilisés sont des erlenmeyers de 125 ml contenant chacun 25 ml de milieu de culture stérile, défini précédemment. A partir de culture en milieu gélosé ou en milieu liquide, nous procédons à la première phase de culture. Puis, afin de nous trouver dans tous les cas en phase exponentielle de croissance, nous repiquons encore notre souche, après un broyage mécanique, pour une phase II de culture. Le broyage a l'avantage de fractionner en tout petits morceaux le mycélium que l'on rend ainsi plus facilement quantifiable par volume. La préparation des phase II de culture a été définie par Chien, Rosazza et Smith depuis 1975 mais sans l'étape du broyage [94,96,105,123,124]. Un broyage du mycélium augmente le taux de croissance μ après un certain temps de culture [129].

La Figure II.11 montre le schéma suivi pour tous nos essais.

L'inoculum mis dans les erlenmeyers en phase II de culture représente toujours 1% du volume de milieu, soit 250 μ l de culture en phase I. Cela correspond à une certaine biomasse qui sera déterminée statistiquement.

b) Paramètres de la croissance

La croissance est suivie, en erlenmeyers, par deux paramètres : le poids sec et le pH. En effet, lors de ces expérimentations, on ne peut contrôler que quelques paramètres : la température, le pH et le poids sec.

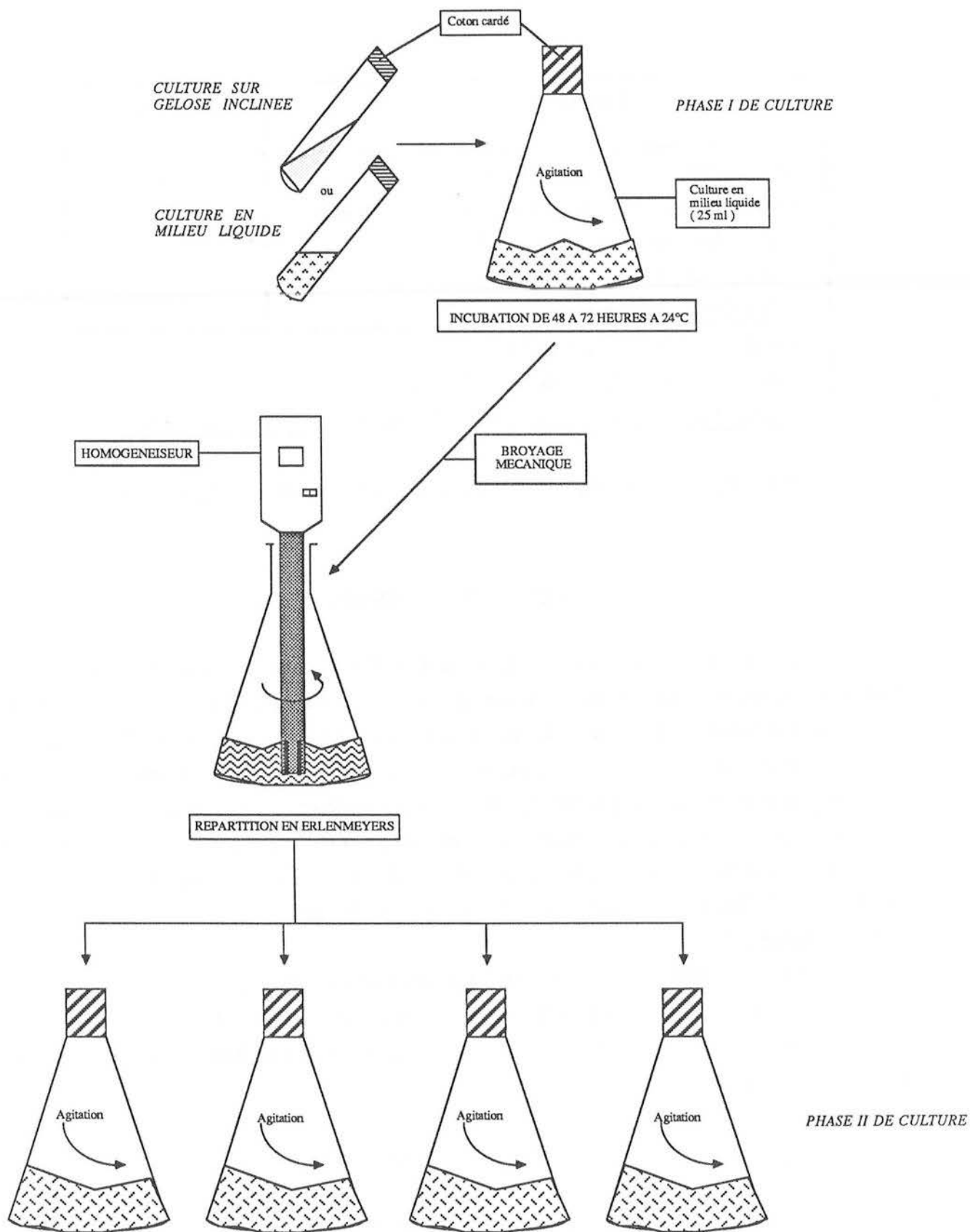


FIGURE II.11 : PREPARATION DES CULTURES.

Le pH est pris chaque jour sur des cultures témoins accompagnant les essais de transformations par un pH-mètre portatif automatique préalablement étalonné.

Le poids sec est déterminé par la mesure de la biomasse fongique à des temps donnés après déshydratation complète. La technique, très simple, consiste à filtrer le champignon et le milieu de culture, contenus dans l'erlenmeyer, sur un filtre de 0,45 μm (Millipore, type HATF) préalablement taré. Après cette filtration, on place le filtre et la biomasse fongique retenue sur ce filtre dans une étuve à 100°C pendant 1 heure. Après séchage complet, on obtient le poids sec. On peut déterminer de cette manière une croissance fongique en fonction du temps ainsi qu'un taux de croissance μ .

c) Introduction de l'Ellipticine

L'Ellipticine a été fournie par la Sanofi (ref: RD/6973).

L'incorporation de l'Ellipticine dans le milieu de culture nécessite sa dissolution dans un solvant organique puisque c'est une substance hydrophobe. Mais ce solvant doit être miscible à l'eau puisque le but est d'introduire l'Ellipticine dans un milieu aqueux. L'ensemble des publications semble en accord sur le diméthylformamide (DMF) qui sert non seulement pour notre substance mais aussi pour d'autres composés tels la pentoxyfilline ou l'acronycine. Ce solvant n'aurait aucune incidence sur la croissance fongique dans la limite de 10% du volume de culture [83]. Le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'acétone, le méthanol ou l'éthanol peuvent également être utilisés [96,102]. Un adjuvant comme le polyvinyl de pyrrolidone (P.V.P) permettant d'augmenter la solubilité de l'Ellipticine dans ces solvants a été mentionné [124].

Les concentrations d'Ellipticine dissoute dans le diméthylformamide sont comprises entre 1 et 300 mg.ml^{-1} . Les concentrations admises par les auteurs en volume final dans les cultures sont de 0,2 à 5 mg.ml^{-1} de milieu. Les valeurs les plus courantes se situent entre 200 et 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ [94, 102,103,105].

Nous utilisons donc le DMF comme solvant de l'Ellipticine dans des concentrations relativement faibles de l'ordre de 1 à 10 mg.ml^{-1} . Dans le milieu de culture, nous ferons en sorte que le taux de DMF en volume ne dépasse pas 5% et que la concentration finale d'Ellipticine dans le milieu soit comprise, selon les expériences, entre 10 et 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Ces quantités, beaucoup plus faibles que celles données dans la littérature, s'expliquent par deux éléments. D'abord, nous ne disposons que de très faibles quantités d'Ellipticine et ensuite, il faut préciser que notre ambition est de tester un grand nombre d'erlenmeyers sans oublier les fermenteurs. Pour ces deux raisons et après quelques tâtonnements, nous avons opté pour une concentration moyenne de 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ soit 500 μg par erlenmeyer de 25 ml.

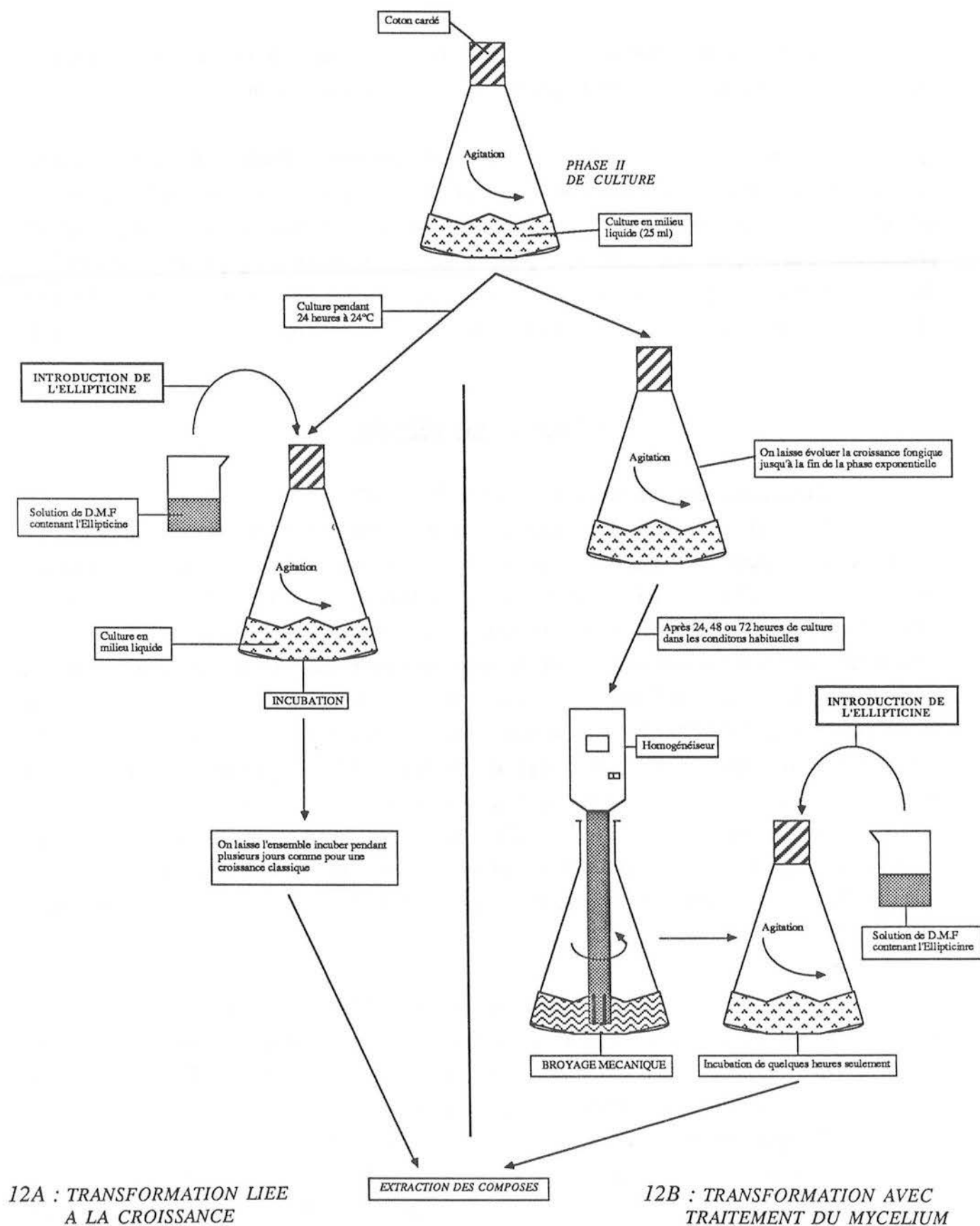


FIGURE II.12A ET 12B : METHODOLOGIE COMPAREE DE LA BIOCONVERSION DE L'ELLIPTICINE.

d) Biotransformation de l'Ellipticine

La transformation de l'Ellipticine en un dérivé 9-hydroxylé suit classiquement le schéma type cité dans les publications [94,96,105,122,124]. La Figure II.12A précise la méthodologie classiquement appliquée. Nous parlerons de transformation liée à la croissance. En effet, après le repiquage en phase II de culture de notre souche (cf. Figure II.11), la substance à transformer est ajoutée 24 heures après le début de culture. On laisse faire la conversion pendant 7 jours. Puis, on procède à l'extraction des composés transformés [94].

Après avoir appliqué cette technique, nous nous sommes interrogés sur l'opportunité d'une modification de cette méthode. En effet, d'après l'étude bibliographique faite au chapitre précédent, plusieurs constatations s'imposent :

- la culture en erlenmeyers, de par l'absence de système d'agitation interne, provoque la formation d'un ou plusieurs pellets, véritables pelotes dont l'intérieur est en anaérobiose. Ce phénomène est la cause d'un mauvais transfert de matières et d'oxygène notamment;
- un broyage intensif de la biomasse mycélienne permet de se rapprocher des formes obtenues en réacteur et favorise aussi les échanges métaboliques [121,129]. Cependant, une telle action ne doit pas détruire le champignon;
- le système enzymatique responsable de la bioconversion de l'Ellipticine est enchassé dans les membranes du réticulum endoplasmique. Si l'on veut un meilleur passage de l'Ellipticine vers ces enzymes, il est logique de penser qu'un broyage favoriserait ce transfert. En outre, l'Ellipticine étant un inhibiteur de son propre système de transformation, on peut se demander si le fait de laisser longtemps cette substance en contact avec le système fongique est réellement important ou intéressant;
- enfin, on peut supposer que, si le cytochrome P-450 est responsable de la production du dérivé 9-OH ellipticine, sa quantité sera liée à celle de la biomasse.

Aussi, avons-nous modifié la technique décrite sur la Figure II.12A en pratiquant à l'issue de la phase exponentielle de croissance un broyage mécanique intense de la biomasse fongique puis en ajoutant, seulement à ce moment là, la substance à transformer. On laisse incuber quelques heures puis on procède, comme pour la première technique, à l'extraction des composés éventuellement transformés. La Figure II.12B précise notre méthodologie.

2°/ Essais effectués en fermenteur

Les essais menés en fermenteur nous apparaissaient très importants dans la mesure où le passage d'un stade expérimental de petits erlenmeyers à un stade pilote où l'on maîtrise mieux certains paramètres n'est pas toujours évident. De plus, maints articles nous permettaient de mesurer l'importance d'une étude en réacteur pilote [125,129,130].

A l'heure actuelle, les fermentations sont pratiquement exclusivement conduites dans des réacteurs à système d'agitation classique.

Cependant, l'analyse de la mécanique des fluides réalisée dans un tel réacteur montre que la plus grande partie de l'énergie disponible ne sert qu'au maintien du mouvement de rotation. Ainsi, seule une petite partie de cette énergie transférée au système est utilisée pour l'écoulement secondaire qui, lui, est réellement important dans un processus de mélange. De cette façon, le mélange obtenu n'est pas homogène ce qui conduit à une dissipation importante de l'énergie initiale transférée au fermenteur.

L'utilisation de ce réacteur, tant sur le volume réactionnel potentiellement efficace que sur le mélange effectué, est donc médiocre. Quelques essais tentés avec notre champignon filamentueux ont montré que la suspension mycélienne obtenue n'est pas homogène et provoque des problèmes importants d'agitation et de transferts de matières.

Certains auteurs utilisent des substances adjuvantes qui diminuent la taille des pellets formés en empêchant l'adhésion des hyphes les unes aux autres [131].

Sur la base de ces constatations, le laboratoire du professeur Brauer a conçu l'"Hubstrahlbioreaktor" que l'on peut traduire par réacteur pulsé. Ce réacteur ne recèle aucun élément de rotation. Il consiste en un cylindre dans lequel se meut un ensemble appelé "Hubelement" dont le mouvement périodique est purement linéaire et vertical.

Ce réacteur a été utilisé avec succès dans le traitement biologique des eaux usées avec une réelle efficacité. La durée du traitement ainsi effectué a été largement réduite par rapport à celle des systèmes conventionnels de traitement [125]. De même, dans les dernières années, ce réacteur a également été testé avec succès pour la production d'acide citrique par *Aspergillus niger*, et pour la production d'éthanol par *Zymomonas mobilis*.

Une conséquence évidente des résultats obtenus par ce nouveau type de réacteur a été l'application de ce système à la production ou à la synthèse de substances biologiques à hautes valeurs ajoutées. En effet, le génie fermentaire se heurte à de nombreux problèmes liés à la conception des fermenteurs classiques: par exemple, l'agitation optimale des microorganismes, les transferts d'oxygène et de matières.

a) Description du fermenteur

La Figure II.13 nous présente une photographie de l'appareillage développé à Berlin. L'installation et le fonctionnement de l'"Hubstrahlbioreaktor" sont décrits sur la Figure II.14. Le bioréacteur est constitué d'un corps cylindrique en verre de 20 cm de diamètre et de 40 cm de haut. Il a une capacité de 12,5 litres, mais en début de fermentation, on le remplit avec 10 litres de milieu nutritif. A l'intérieur de ce cylindre, on dispose d'un ensemble axial sur lequel se fixent cinq disques percés de nombreux trous. La distance entre deux disques est de 50 mm et le diamètre des trous faits dans les disques est de 12 mm, deux trous étant espacés de 27 mm. Les disques troués sont en polypropylène, polymère thermoplastique qui évite l'adhérence des microorganismes sur les disques lorsqu'ils sont lisses.

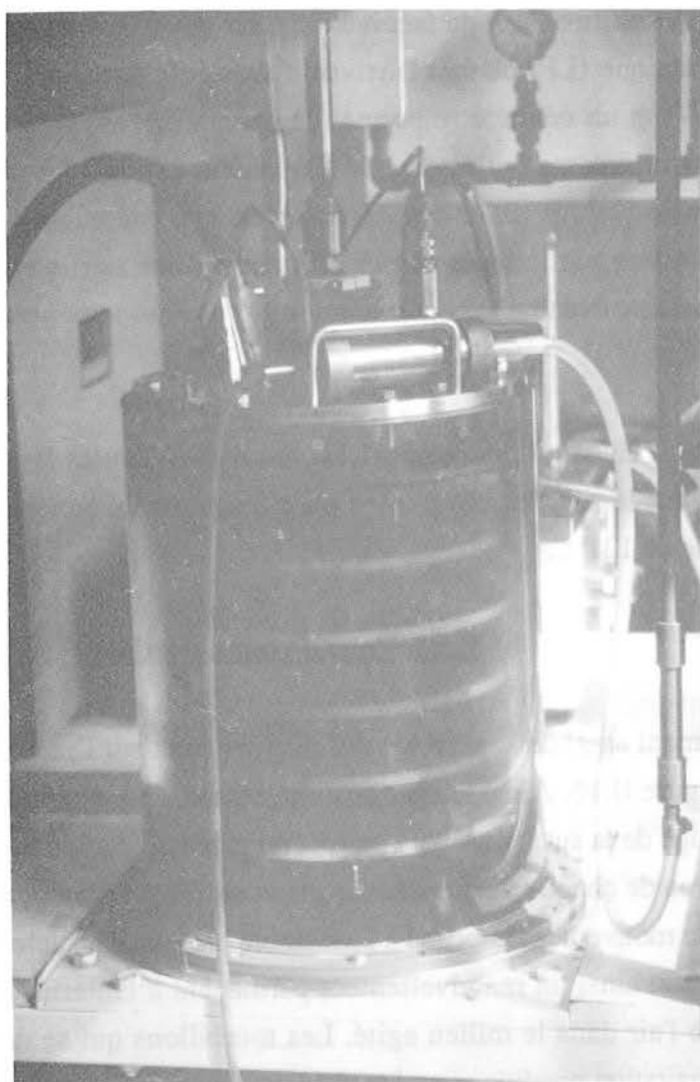


FIGURE II.13 : VUE GENERALE DU FERMENTEUR "PULSE"
("HUBSTRAHLBIOREAKTOR").

La fréquence du mouvement vertical de cet ensemble axial est comprise entre 0,25 et 1,25 Hz. L'amplitude choisie du mouvement conféré à l'ensemble est de 100 mm correspondant à 5 disques maximum. La surface des trous ainsi percés représente 15% environ de la surface d'un disque. Les disques sont installés de façon à éviter un alignement des trous.

Le fond et le haut de ce réacteur sont en acier inoxydable. Sur le couvercle, on trouve des ouvertures pour la tige axiale d'une part, pour l'instrumentation (sonde de pH, sonde à O₂) et pour l'inoculum d'autre part. L'étanchéité entre le couvercle et la tige axiale permettant le mouvement est assurée par un soufflet stérilisable. Le fond dispose également de bossages pour l'arrivée d'air et pour la prise d'échantillons.

Une circulation d'eau thermorégulée à 24°C permet de maintenir une température constante dans le bioréacteur.

La Figure II.14 mentionne l'approvisionnement en air du réacteur. L'air comprimé est d'abord nettoyé dans un préfiltre (VF) de façon à éliminer poussières et huile éventuelles. Ensuite, un filtre stérile en céramique (LF) permet l'arrivée d'air stérile dans le réacteur. Le débit d'air est réglé par une vanne (V) et un débitmètre permet de quantifier l'air injecté dans le réacteur. L'air incorporé en relativement grosses bulles dans le fermenteur est déjà fractionné en de nombreuses petites bulles dès le passage du premier disque. L'air résiduel passe dans un condenseur (RK) qui effectue une déshydratation partielle de cet air. Un autre filtre stérile en céramique (SF) suit le condenseur évitant ainsi une éventuelle contamination par aspiration et permet de séparer la mousse de l'air.

La cuve de l'"Hubstrahlbioreaktor" est amovible. Toutes les parties qui doivent être stérilisées (les électrodes, le soufflet, les parties plastiques...) sont conçues pour être résistantes à une température voisine de 121°C.

b) Mécanismes de transferts dans l'"Hubstrahlbioreaktor"

Le mouvement axial de l'ensemble des disques fixés sur l'axe provoque des turbulences schématisées sur la Figure II.15. Ainsi, à chaque mouvement, un nouvel écoulement est créé. On a donc un très bon mélange de la suspension qui permet un procédé biochimique simultané et identique au niveau de chaque trou de chaque disque dans le réacteur. De plus, lorsque l'on a une introduction d'air dans le réacteur, le mouvement imprimé à l'ensemble provoque l'éclatement et la dispersion des bulles d'air ce qui permet ainsi un renouvellement permanent à l'interface air-liquide et donc une meilleure solubilité de l'air dans le milieu agité. Les tourbillons qui se développent à la suite du mouvement vertical d'agitation conditionnent les phénomènes suivants:

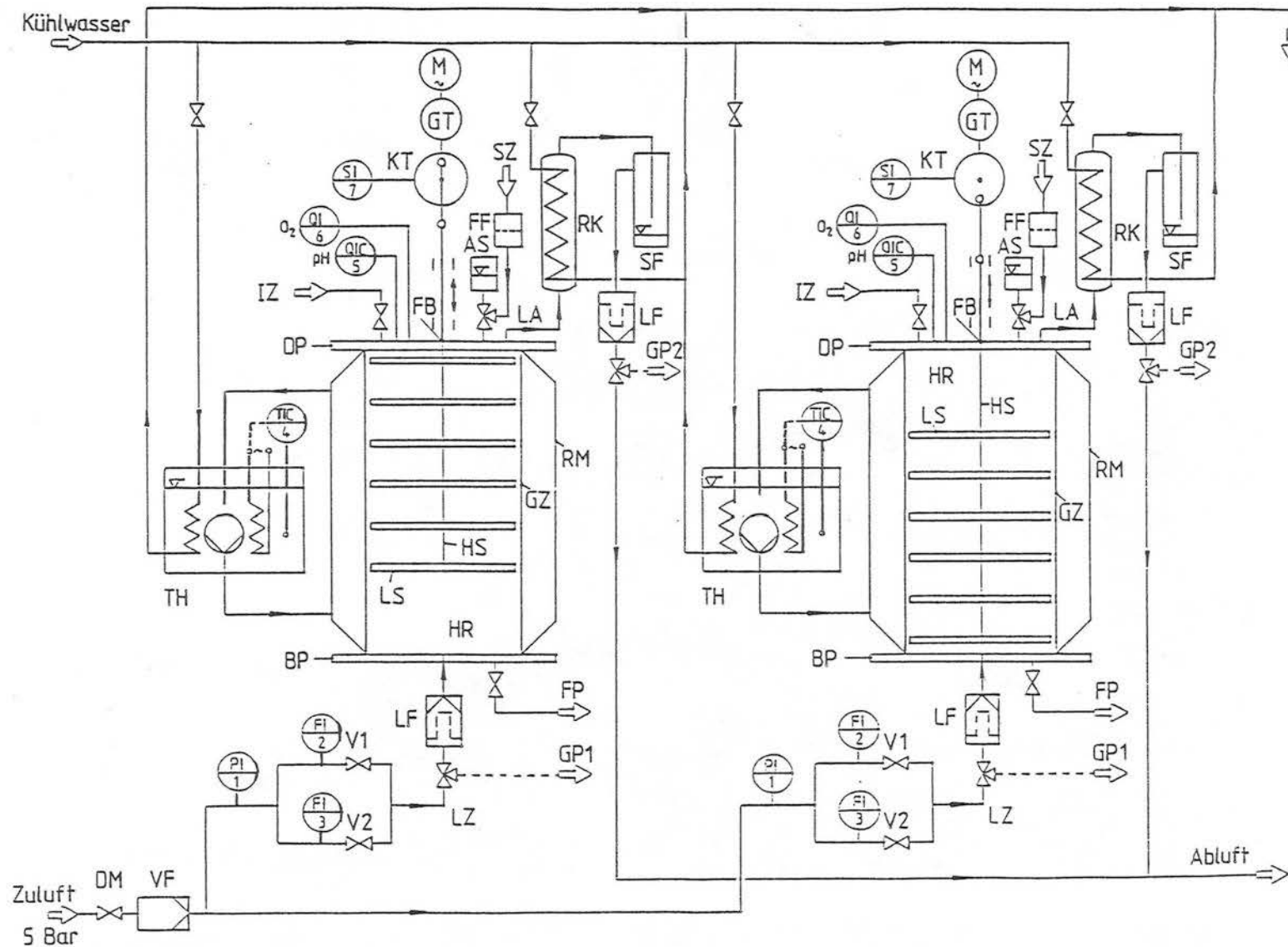


FIGURE II.14 : SCHEMA GENERAL DE L'INSTALLATION ET DU FONCTIONNEMENT DE L'"HUBSTRAHLBIOREAKTOR".
 (La signification des symboles est répertoriée en Annexe II).

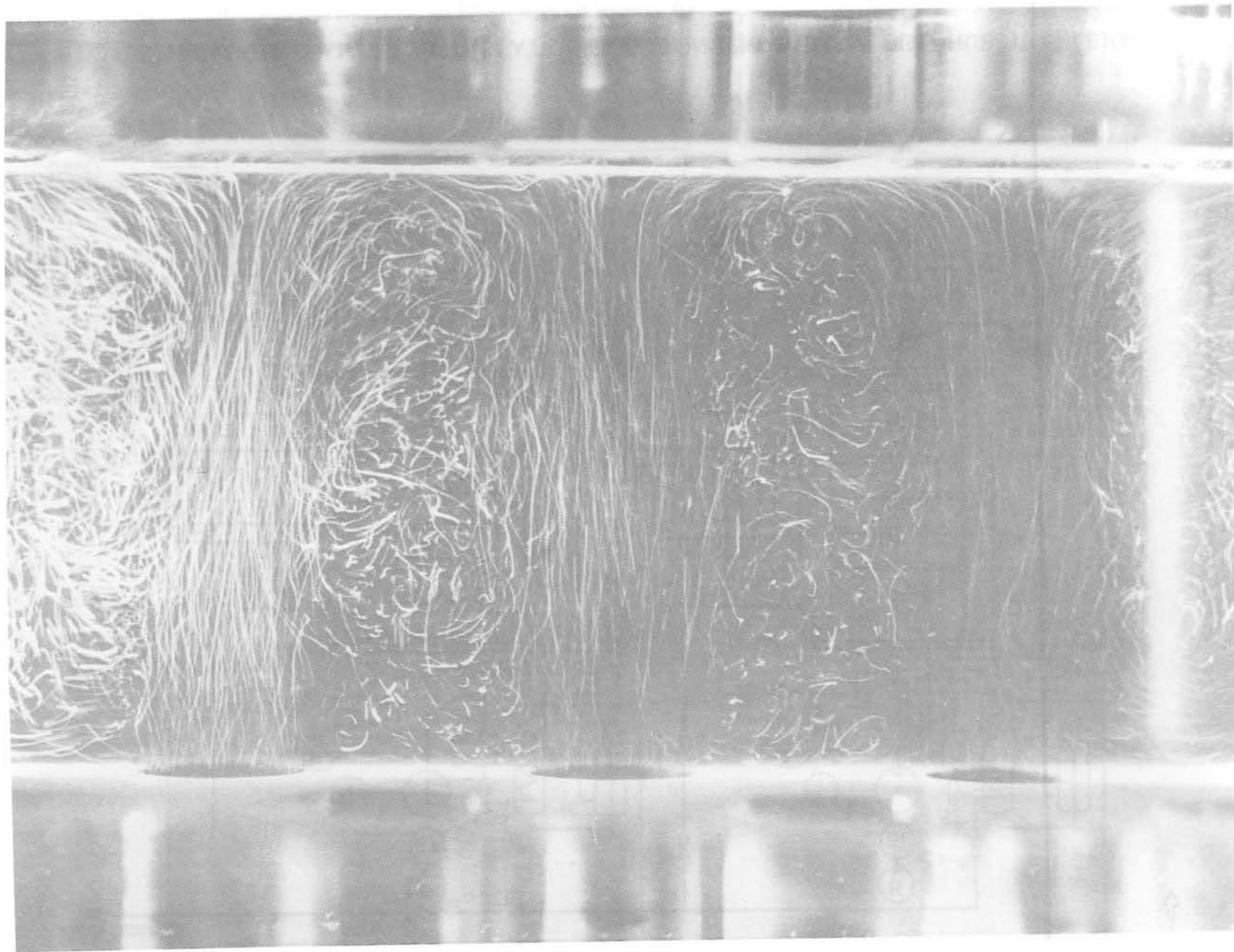


FIGURE II.15 : PHOTOGRAPHIE DE PARTICULES FLUORESCENTES SCHEMATISANT LES TURBULENCES PROVOQUEES LORS DU MOUVEMENT D'AGITATION D'UN DISQUE.

- fragmentation accrue du mycélium limitant la formation de "pellets" et amélioration sensible de l'interface milieu-microorganismes, d'où une augmentation notable de l'homogénéité de la suspension microbienne dans toutes les directions;
- accroissement des capacités biochimiques des microorganismes;
- renouvellement périodique des bulles d'air et transfert d'oxygène accru caractérisé par un système de transport de matière multiphasique. L'absorption de l'oxygène est souvent le facteur limitant des fermentations.

c) Conditions opératoires

Le protocole suivi diffère légèrement de celui suivi pour les essais menés en erlenmeyers dans la mesure où nous excluons tout broyage pour la phase de transformation de l'Ellipticine.

Préparation de l'inoculum

Le milieu de culture adopté est le même que celui défini au chapitre II.3.3.2.1. hormis quelques variations de la concentration de glucose dans le milieu, comprise entre 10 et 30 g.l⁻¹, ce qui nous a permis de faire des études de croissance fongique dans ce réacteur.

La Figure II.16 résume schématiquement l'ensemble de la manipulation nécessaire à la préparation de l'inoculum en vue d'une fermentation. Ce schéma reprend la préparation d'une culture décrite à la Figure II.11 et complétée par des repiquages en erlenmeyers de plus grande contenance. Le deuxième broyage est réalisé de façon à obtenir un inoculum le plus liquide possible donc facilement quantifiable. L'inoculum, de quantité variable, représente entre 1,5 et 8 % du volume final de fermentation.

Démarrage de la fermentation

L'"Hubstrahlbioreaktor" est stérilisé avec un milieu de culture identique à celui utilisé pour les précultures. Le volume de milieu de culture préparé est de 10 litres. On a, de plus, ajouté 2 ml de Silicone, ou autre agent anti-moussant connu.

L'inoculum est ensuite ajouté à ce milieu stérilisé après régulation de la température de l'ensemble du réacteur à 24°C.

Paramètres de la fermentation

Le système d'agitation de l'"Hubstrahlbioreaktor" permet de choisir une fréquence comprise entre 0,25 et 1,25 Hertz. La fréquence de 0,65 Hz a été choisie en fonction des résultats obtenus pour la production d'acide citrique par *Aspergillus niger*. La température est toujours fixée à 24°C, tandis que nous avons établi le débit d'air comprimé entre 0,15 m³.h⁻¹ et 0,6 m³.h⁻¹ (pour 3 bars de pression). Cela signifie un débit d'air compris respectivement entre 1,3 et 5,2 litres d'air par litre de milieu et par minute.

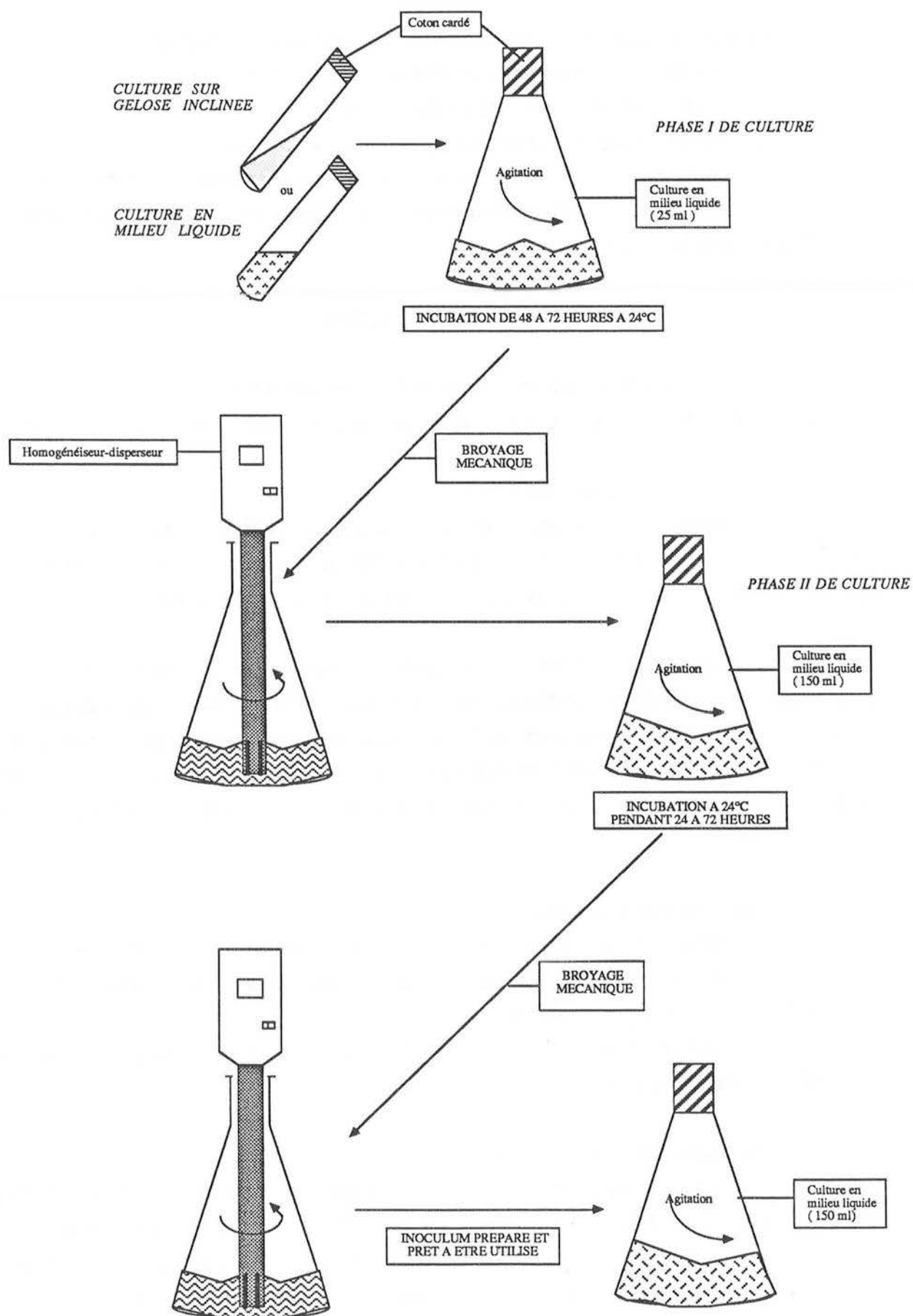


FIGURE II.16 : PREPARATION DE L'INOCULUM.

Tout au long de la fermentation, nous opérons des mesures de:

- poids secs mycéliens selon la technique déjà décrite. Les prélèvements sont de l'ordre de 100 ml au minimum deux fois par jour. Sur ces prises d'essais, nous faisons régulièrement des observations microscopiques et un test de Gram pour vérifier la pureté de notre culture;
- glucose résiduel par le test enzymatique à la glucose oxydase sur le milieu de culture prélevé pour les poids secs et filtré sur filtre 0,45 μm ;
- pH par lecture directe sur l'électrode implantée dans le réacteur et étalonnée avant stérilisation;
- saturation en pourcentage d'oxygène de l'air par lecture directe sur l'électrode à oxygène implantée dans le réacteur. L'étalonnage de cette électrode se fait classiquement par bullage intense d'air stérile fixant le 100% de saturation, puis par bullage d'azote fixant le 0%.

Bioconversion de l'Ellipticine

L'Ellipticine est dissoute dans du DMF ou parfois dans du méthanol dans les mêmes gammes de concentrations finales (10 à 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de culture) que celles précédemment données.

L'introduction de l'Ellipticine suit les protocoles déjà mentionnés Figures II.12A et 12B avec cependant une différence : en effet, il n'y a pas d'étape de broyage de la biomasse mycélienne obtenue. Notre étude consiste donc à effectuer d'une part, la transformation liée à la croissance de la biomasse et, d'autre part, une conversion après croissance et avec contact limité entre la souche fongique et l'Ellipticine. Cette méthodologie respecte ainsi le précédent protocole, ce qui nous permettra une comparaison objective.

Après les essais de transformation, on procède comme dans le cas des essais faits en erlenmeyers à l'extraction de nos composés formés.

II.4 - EXTRACTION DE L'ELLIPTICINE ET DE SES DERIVES

Après la bioconversion de l'Ellipticine, un obstacle subsiste : son extraction du bouillon de culture obtenu. Le but est donc d'extraire de ce milieu non seulement l'alcaloïde mais aussi tous les dérivés formés. L'extraction des dérivés qui nous intéressent passe donc nécessairement par une étape de broyage de la biomasse microbienne obtenue. En effet, la production de la 9-OH ellipticine se fait au contact du système enzymatique des monooxygénases situé dans les membranes du réticulum endoplasmique fongique. Les molécules converties par le cytochrome P-450 restent dans le réticulum endoplasmique. Cette conversion endocellulaire va nécessiter la destruction des structures membranaires de façon à pouvoir extraire les molécules transformées.

A ce titre, il est curieux de constater qu'il n'existe pratiquement pas d'informations sur ce problème de traitement de la biomasse.

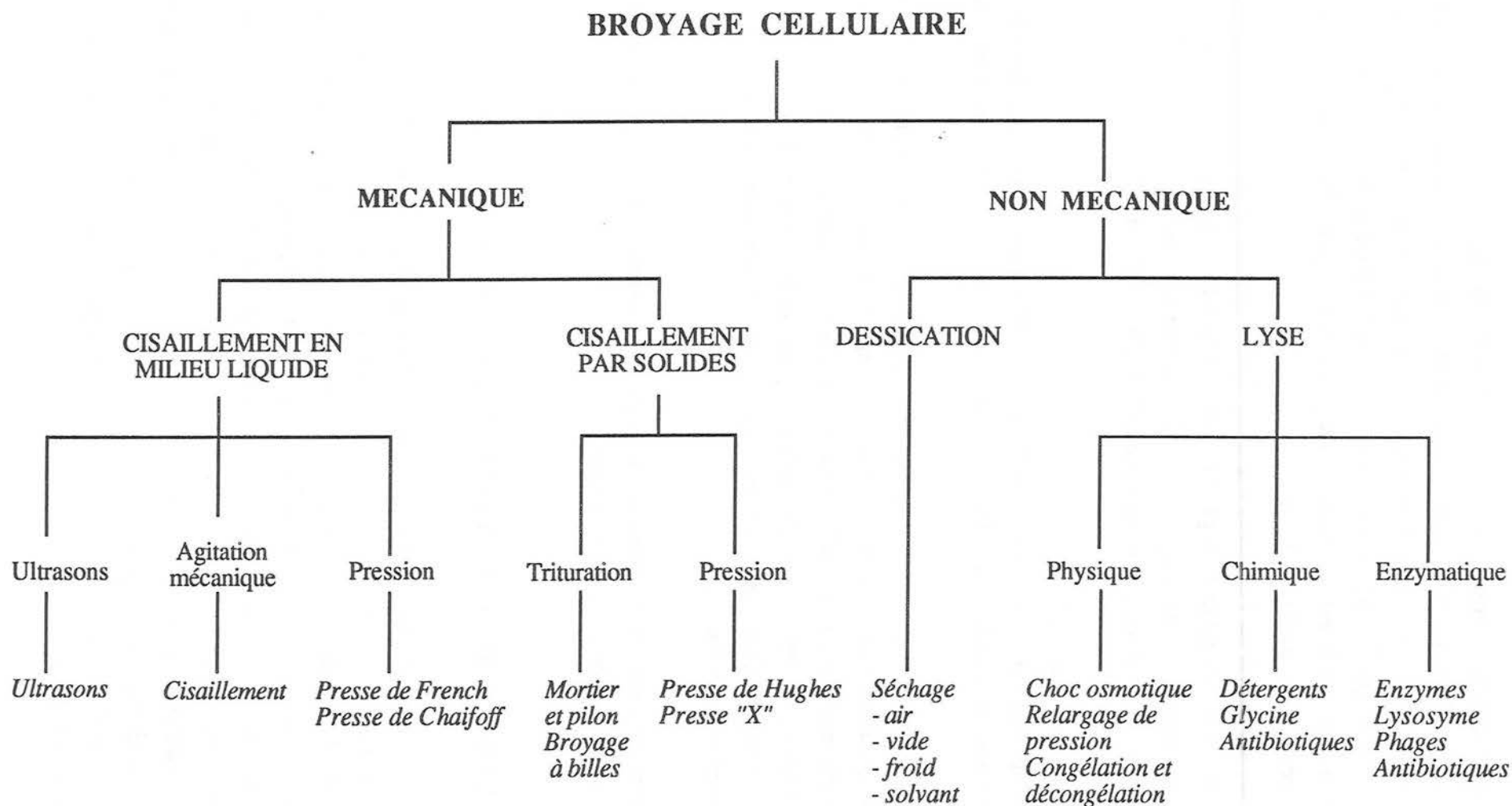


FIGURE II.17 : SCHEMA GENERAL DES SYSTEMES DE DESTRUCTION CELLULAIRE.

II.4.1 - BROYAGE DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

La rupture des structures cellulaires des microorganismes est rattachée à l'extraction ou à la libération des enzymes des cellules ou des composants cellulaires par des moyens mécaniques ou non mécaniques.

Une classification des méthodes de broyage cellulaire est présentée sur la Figure II.17.

II.4.1.1 - Les différents systèmes de broyage

On constate qu'il existe de nombreuses méthodes de broyage cellulaire, notamment conçues pour le laboratoire. En fait, toutes ne sont pas utilisables dans des procédés de grande envergure. Cela est dû d'une part aux restrictions technologiques des matériels disponibles et, d'autre part, aux questions de temps pour un système donné.

En fonction de quels critères peut-on utiliser une méthode ? La réponse peut être définie selon cinq paramètres :

1. La susceptibilité microbienne pour une méthode choisie.
2. Les caractéristiques de stabilité enzymatique.
3. La facilité d'extraction des enzymes ou des produits cellulaires des débris cellulaires.
4. Le taux de désintégration cellulaire et le relargage d'enzymes.
5. La facilité de l'opération, sa simplicité et le coût du procédé.

Si l'on a de nombreuses données bibliographiques sur le broyage cellulaire des bactéries et levures, il n'y a, en revanche, que très peu de publications concernant cette technique sur les champignons. On considère généralement que les méthodes de destruction des levures sont applicables aux champignons filamenteux [132,133].

II.4.1.2 - Moyens de broyage testés

Ne sachant quelle technique de broyage était la plus efficace sur nos champignons, nous avons décidé de tester plusieurs moyens mécaniques :

- méthode par Ultrasons (désintégrateur à Ultrasons Vibra Cell®, type M SON 01),
- méthode par cisaillement par agitation mécanique (disperseur-homogénéiseur Ultraturax®, type TP 18-10),
- méthode par trituration par un broyage à billes (broyeur à billes Retsch®, type MM2); les bols de broyage de contenance maximale de 15 ml (volume utile 12,5 ml) sont en acier inoxydable et les billes sont en verre de 0,25 à 0,5 mm de diamètre.

Ces méthodes seront couplées à une ou plusieurs méthodes non mécaniques :

- méthode physique par congélation à -20°C et décongélation des essais,
- méthode enzymatique avec utilisation de : cellulase (Sigma®, ref: C 2415) et lysosyme (Sigma®, ref: L 6876).

II.4.2.- EXTRACTION DES COMPOSÉS

Tout système d'extraction est complexe, non seulement à cause des molécules mises en jeu, mais aussi du fait des interactions physico-chimiques rencontrées. Le but de cette opération consiste à extraire les substances hydrophobes de notre milieu de culture avec le maximum d'efficacité. On tentera donc de se rapprocher d'un rendement maximal à partir de la connaissance du rendement théorique de notre système d'extraction.

II.4.2.1 - Etude théorique succincte

Pour calculer le rendement théorique d'une extraction nous avons besoin de connaître le rapport de distribution du produit dans les phases. En effet, si une solution d'une espèce neutre A dans un solvant S est mise en contact avec un solvant E non miscible à S, des molécules de A vont migrer de la phase S vers la phase E au travers de l'interface liquide-liquide qui sépare les deux solvants. L'équilibre de partage entre S et E est de la forme : $A_S \rightleftharpoons A_E$

Le rapport de distribution s'appelle coefficient de partage K et est défini par :

$$(1) \quad K = \frac{a_S}{a_E} \quad a : \text{Activité de la substance dans le solvant organique } (a_S) \text{ ou dans l'eau } (a_E).$$

L'activité de A dans une phase peut être reliée à sa concentration [A] dans la même phase par :

$$a = \gamma[A]$$

avec γ : coefficient d'activité mesurant la différence de réactivité de A entre le milieu considéré et le milieu de référence, qui est le milieu pour lequel γ est pris égal à 1 par convention.

Le milieu de référence habituellement choisi est la solution infiniment diluée de A dans le solvant pur dans chaque phase. Si l'on dissout une quantité très faible de A dans le système binaire, on peut alors considérer que les concentrations correspondent aux activités et l'on peut écrire :

$$(2) \quad K = \frac{[A]_S}{[A]_E}$$

Ceci n'est pas vrai dans le cas de grandes quantités de A puisque l'on atteint les limites de solubilité dont il faut alors tenir compte et l'on ne peut pas assimiler concentration et activité.

K étant un rapport de concentration molaire, il est simple de l'exprimer en fonction des concentrations massiques (donc des solubilités). L'équation (2) se transforme alors en :

$$(3) \quad K = \frac{S_S}{S_E}$$

Avec S_S et S_E les solubilités de cette même substance dans les deux phases.

On conçoit que le coefficient de partage K doit être très différent de 1 pour qu'une extraction soit facilement et techniquement possible.

Pratiquement, la notion la plus utile est celle de rendement d'extraction R (exprimé en %) défini comme la fraction (en %) de la quantité totale d'espèce mise en jeu dans le système que l'on retrouve en phase organique à l'équilibre :

$$R = \frac{100 \cdot Q_S}{Q_E + Q_S}$$

avec Q_E et Q_S , les quantités totales de l'espèce en phase aqueuse et organique.

Il existe une relation simple entre R et K, faisant intervenir les volumes V_E et V_S des phases aqueuses et organiques et les concentrations, écrites plus simplement, C_E et C_S , en effet :

$$Q_E = V_E \cdot C_E \quad \text{et} \quad Q_S = V_S \cdot C_S$$

$$\text{d'où} \quad R = \frac{100 \cdot K}{K + \frac{V_E}{V_S}}$$

Lorsqu'un simple équilibre ne permet pas d'isoler l'espèce à séparer, on est amené à multiplier le nombre d'équilibre d'extraction afin d'obtenir une opération quantitative.

Si C_{E0} représente la concentration de cette espèce dans la phase aqueuse initiale de volume V_E et V_S le volume de la phase organique de chaque extraction; après le premier équilibre, les concentrations C_{E1} et C_{S1} dans les deux phases sont liées par :

$$V_E \cdot C_{E0} = V_E \cdot C_{E1} + V_S \cdot C_{S1}$$

$$\text{d'où} \quad C_{E1} = C_{E0} \cdot \left[\frac{1}{1 + K \cdot \frac{V_S}{V_E}} \right]$$

De la même façon, après n extractions, la concentration C_n de l'espèce restant dans la phase aqueuse sera liée à la concentration C_{n-1} par :

$$C_n = C_{n-1} \cdot \left[\frac{1}{1 + K \cdot \frac{V_S}{V_E}} \right] \quad \text{d'où} \quad C_n = C_0 \cdot \left[\frac{1}{1 + K \cdot \frac{V_S}{V_E}} \right]^n$$

II.4.2.2 - Méthodologie suivie

Quelques articles sur la bioconversion de l'Ellipticine ou de la 9-OCH₃ ellipticine donnent des informations à la fois précises et incomplètes [94,105,124]. La méthode d'extraction proposée n'est jamais vraiment explicitée.

Par conséquent, nous nous sommes attachés, au cours d'une étude préliminaire, à déterminer les conditions optimales d'extraction des composés antitumoraux à partir des éléments décrits dans la littérature. Nous testerons la validité du modèle théorique sur un système témoin sans champignon. Ce témoin consistera en un milieu de culture de 25 ml dans lequel nous introduirons 200 µg d'Ellipticine et de 9-OH ellipticine. Ensuite nous tenterons de vérifier les résultats sur des essais de bioconversions réalisées en erlenmeyers ou en fermenteurs.

II.4.2.2.1 - Détermination des paramètres optimaux

L'obtention d'un bon rendement d'extraction est fonction de nombreux paramètres que nous nous efforcerons de cerner.

1 - *Le solvant* : L'Ellipticine et ses dérivés étant des composés hydrophobes, il paraît logique de chercher un solvant organique non miscible à l'eau de façon à extraire ces substances à partir d'un milieu aqueux. Le problème posé est donc inversé par rapport à celui de la dissolution de l'Ellipticine dans le milieu de culture. Que ce soit pour l'acronycine, la pentoxyfylline ou tous les composés formés par notre alcaloïde indolique, les auteurs utilisent toujours l'acétate d'éthyle [27,46,49,94,96,99,100,102,103,105,123,124]. Ce solvant est complété à 10% en volume par le n-butanol [47,50,94,105,124]. Nous testerons, en outre, le dichlorométhane et l'acétone malgré leur miscibilité à l'eau, ainsi que l'éther.

2 - *Le volume de solvant* : Pour des raisons évidentes de rentabilité du procédé, nous avons étudié le rapport des volumes optimaux de solvant par rapport au volume de la phase aqueuse. Les auteurs préconisent en général une extraction par un volume de solvant égal au volume de milieu en plusieurs fois.

3 - *Le pH* : Si la littérature donne un pH de 8,5 [94,105] à ajuster avant l'extraction, elle n'explique ni pourquoi, ni si d'autres valeurs peuvent être au moins équivalentes en efficacité. Selon

les valeurs de pKa de nos substances définies au chapitre I, il paraît probable qu'un pH d'extraction alcalin serait meilleur. Néanmoins, nous avons testé une gamme de pH située entre 2 et 12 sur des essais témoins et sur des essais de transformation de l'Ellipticine.

4 - *La durée d'extraction* : Cette question n'est jamais précisée dans la bibliographie. Il n'est mentionné qu'une macération du milieu de culture dans un volume de solvant organique. En supposant que le transfert à l'interface soit immédiat, nous avons observé, pour un volume donné, les transferts de masse en fonction du temps sur des essais témoins.

5 - *Le nombre d'extraction* : L'extraction a été effectuée successivement 5 fois sur un même échantillon pour déterminer le nombre d'extractions nécessaire et suffisant lié au rendement maximal voulu.

II.4.2.2.2 - Schéma d'extraction suivi

La principale difficulté dans un système d'extraction tel que celui-ci réside dans le transfert optimal des substances d'une phase hétérogène comme notre système fongique à une phase homogène constituée par le solvant organique.

Cette considération nous a incité à pratiquer plusieurs étapes additionnelles au schéma type d'extraction résumées sur la Figure II.18.

- Congélation - décongélation : méthode physique qui permet la lyse d'une petite partie de la culture mycélienne par fragilisation des structures cellulaires.
- Broyage mécanique : plusieurs systèmes ont été testés (cf. chapitre II.4.1.2).
- Homogénéisation par agitation mécanique (Ultraturax®) de façon à obtenir un meilleur mélange dynamique des deux phases et augmenter ainsi l'efficacité du transfert.
- Centrifugation pour une séparation optimale de la phase solide (mycélium).
- Décantation pour éliminer les derniers résidus mycéliens ainsi que le milieu de culture.

Ensuite, on récupère la phase organique, mélange d'acétate d'éthyle/n-butanol (9/1 en volume), que l'on évapore sous vide à une température de 50°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi®). On effectue deux lavages en méthanol avant de reprendre le résidu dans un volume connu de méthanol.

On peut alors procéder à l'analyse des dérivés formés après bioconversion fongique.

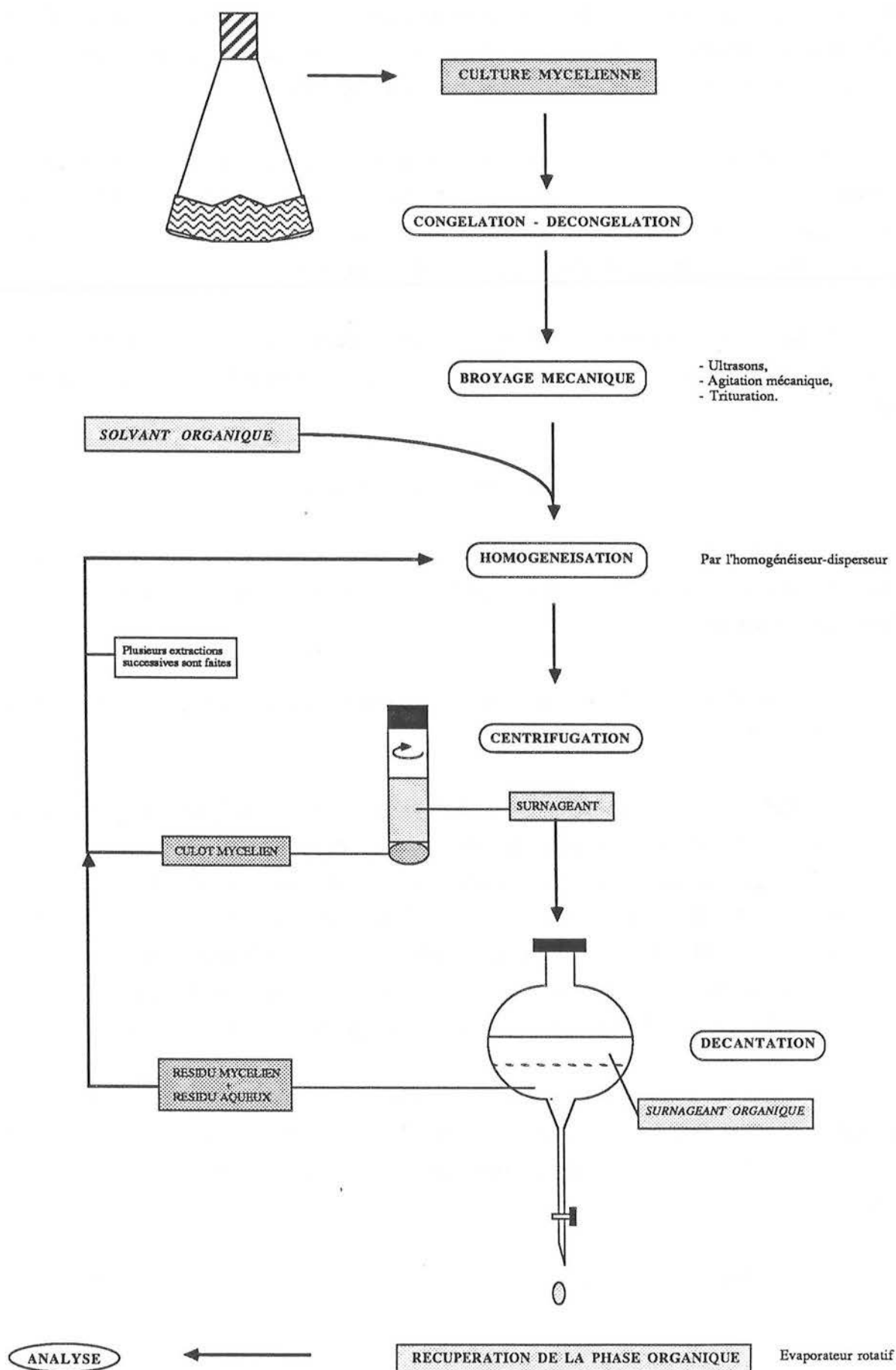


FIGURE II.18 : SCHEMA DE L'EXTRACTION DE L'ELLIPTICINE ET DE SES DERIVES.

II.5 - OXYDATION BIOMIMETIQUE DE L'ELLIPTICINE

Nous avons déjà vu que l'Ellipticine a pour métabolite majeur l'hydroxy-9 ellipticine [31]. Aussi avons-nous recherché, en collaboration avec F.Pautet du Laboratoire de Chimie Organique de l'U.E.R de Pharmacie à Lyon, à réaliser *in vitro* cet aménagement fonctionnel à l'aide de systèmes oxydants à caractère biomimétique.

II.5.1 - PRINCIPE

De façon à réaliser cette oxydation biomimétique, notre choix s'est plus particulièrement porté vers les couples oxydants connus pour leur capacité à réaliser une C-hydroxylation aromatique. Nous avons déjà décrit la structure porphyrinique du cytochrome P-450 capable de procéder à des réactions d'hydroxylation *in vivo* (cf. chapitre I.3). La figure II.20 rappelle la structure d'une porphyrine.

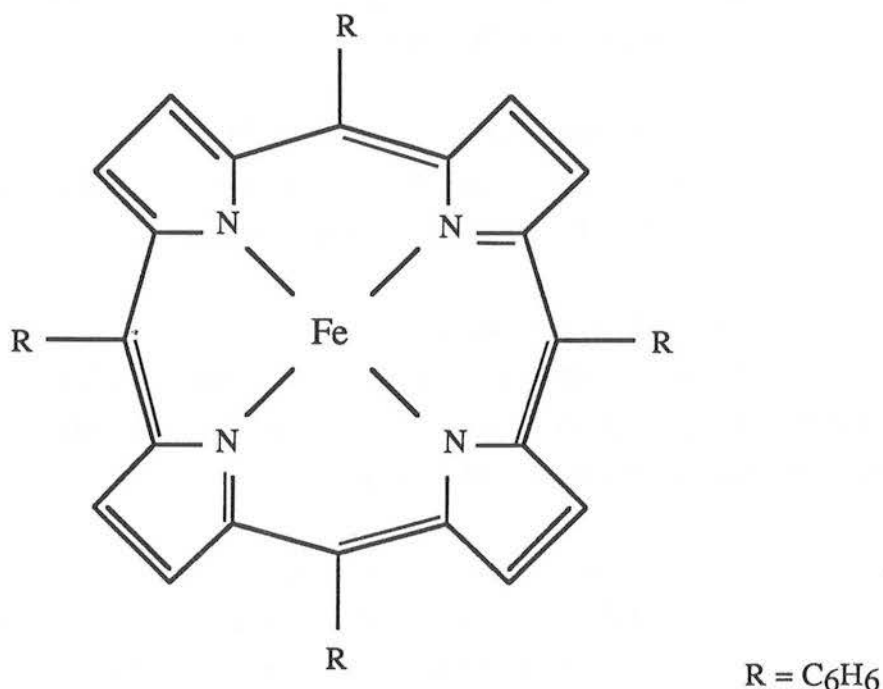


FIGURE II.19 : LA CHLORO MESO TETRAPHENYLPORPHYRINE DE FER^{III}.

Comme, par ailleurs, l'hydroxy-9 ellipticine est très facilement oxydée en 9-oxo ellipticine qui est une structure de type quinone-imine (cf. chapitre I.1), nous avons également orienté nos essais vers des oxydants utilisés pour effectuer la synthèse de telles structures. D'autres systèmes moins spécifiques ont aussi été employés.

D'une façon générale, tous les systèmes utilisés sont capables de réaliser très facilement l'oxydation de la 9-hydroxy ellipticine en 9-oxo ellipticine. De ce fait, lors des essais effectués sur l'Ellipticine, nous avons recherché la présence dans le milieu réactionnel de la 9-oxo ellipticine.

II.5.2 - SYSTEMES EMPLOYÉS

1/ Système iodosylbenzène - métalloporphyrine

L'iodosylbenzène (C_6H_5IO) est capable, en présence de chloro méso tétraphénylporphyrine de fer^{III} (CITPPFe^{III}) comme catalyseur, de transférer son oxygène à un substrat. La Figure II.19 présente ce système qui est capable d'oxyder la phénothiazine en sa quinone-imine. Le milieu réactionnel contient également du sulfoxyde de phénothiazine et un dimère oxydé [134].

2/ Iodylbenzène - acétylacétonate de vanadyle.

L'acétylacétonate de vanadyle $[Vo(acac)_2]$ catalyse le transfert d'un atome d'oxygène de l'iodylbenzène ($C_6H_5IO_2$) à un substrat. Le système est capable comme le précédent d'oxyder la phénothiazine en phénothiazinone-3 (Rendement = 54%) [134].

3/ Système peroxyde d'hydrogène - Fe^{III}

Le couple oxydant constitué d'eau oxygénée et de sulfate ferrique $[Fe_2(SO_4)_3]$ en présence de catéchol, est capable d'hydroxyler le chlorobenzène [135].

4/ Complexes peroxo du vanadium

Ces complexes sont connus pour réaliser l'hydroxylation du benzène et de certains dérivés aromatiques [136,137]. Aussi, le complexe $Vo(O_2)(PIC)(H_2O)_2$ utilisant l'acide picolinique (PIC) comme ligand a-t-il été employé.

5/ Système oxone-métalloporphyrine

L'oxone (hydrogénopersulfate de potassium $KHSO_5$) constitue un donneur d'oxygène capable, en présence d'une métalloporphyrine, de réaliser des oxydations biomimétiques.

En particulier, l'hydroxylation de certains hydrocarbures saturés et aromatiques a été obtenue [138]. Par la suite, pour permettre l'utilisation de cet oxydant en milieu organique anhydre, un dérivé tétra n-butylammonium de l'oxone a été synthétisé [139]. Ces deux types d'oxone associés à la chloro méso tétraphénylporphyrine de fer^{III} ou de manganèse^{III} comme catalyseur ont été utilisés.

6/ Système peroxyde d'hydrogène - Fe^{II}

Le sel ferreux permet la formation de radicaux hydroxylés OH^* responsables des réactions d'hydroxylation [140]. Ce système de Fenton (sulfate ferreux - H_2O_2) de même qu'une de

ses variantes (perchlorate ferreux - H_2O_2 - acétonitrile) (Fenton non aqueux) permet de réaliser l'hydroxylation de certains cyclanes [141].

7/ Système peroxyde d'hydrogène - métalloporphyrine

L'association d'eau oxygénée et d'une métalloporphyrine avec ou sans co-catalyseur de type imidazole permet de réaliser des C-hydroxylations [142]. Les chloro méso tétraphénylporphyrine de fer^{III} ou de manganèse^{III} ont été testées.

8/ Oxydation par le sel de Fremy

Le sel de Fremy [Nitrosodisulfonate de Potassium, $\text{ON}(\text{SO}_3\text{K})_2$] est capable de transférer, par voie radicalaire, son atome d'oxygène à un substrat. Il est, en particulier, capable d'oxyder les phénols en quinones et les amines aromatiques secondaires en quinone-imines [143].

Récemment, cet oxydant a été utilisé pour réaliser la synthèse de quinones-imines dans la série des phénothiazines. La phénothiazine-3 a été obtenue avec un rendement de 84% à partir de la phénothiazine. Les dérivés chlorés en -2 et -8 conduisent aux quinone-imines correspondantes avec des rendements respectifs de 27% et 50% [144]. Aussi, il nous a paru intéressant d'envisager l'emploi de cet oxydant dans le cas de l'Ellipticine.

CHAPITRE III

DOSAGE DE L'ELLIPTICINE ET DE SES DERIVES



III - DOSAGE DE L'ELLIPTICINE ET DE SES DERIVES

Afin de déterminer qualitativement et quantitativement les résultats obtenus au cours de notre procédé de transformation, nous avons dû faire appel à différentes méthodes de dosage. Nous allons donc d'abord définir les méthodes chromatographiques que nous avons employées. Ensuite, nous aborderons les problèmes rencontrés lors de dosages d'essais de bioconversion réalisés en erlenmeyers ou en fermenteur. En effet, les dérivés formés subissent des modifications chimiques, notamment des oxydations mais il peut y avoir d'autres types de réactions qui les dégradent. Aussi nous sommes-nous attachés à la quantification des composés formés par une technique colorimétrique, puis à la résolution du problème par stabilisation de la 9-OH ellipticine. Nous tenterons, en conclusion, une comparaison des méthodes utilisées selon les résultats obtenus.

III.1 - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

III.1.1 - RAPPELS ET COMPARAISON

La chromatographie est, en général, une méthode d'analyse immédiate qui permet de séparer les constituants d'un mélange en utilisant la migration différentielle des composants sous l'influence du déplacement d'un fluide (phase mobile) sur un milieu poreux doué de propriétés d'adsorption, de partage, d'affinité, de filtration ou d'échange (phase stationnaire).

Ainsi, sous l'influence des deux effets antagonistes, effet d'entraînement exercé par la phase mobile et effet de rétention exercé par la phase stationnaire, les constituants du mélange se déplacent à des vitesses différentes et sont ainsi séparés.

On peut classer les méthodes chromatographiques de trois manières différentes, selon la nature des phases, selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation et selon la technologie de la mise en œuvre de la méthode. La Figure III.1 donne un aperçu de la classification des méthodes chromatographiques :

- chromatographie en phase gazeuse;
- chromatographie en phase liquide sur colonne;
- chromatographie de surface en phase liquide.

Au cours de notre travail, nous avons utilisé les deux méthodes citées dans la bibliographie relatives à la 9-OH ellipticine : la chromatographie sur couche mince (C.C.M) [27,46,50,94,100,105] et la chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P) [37,46,47,49,124,145-148].

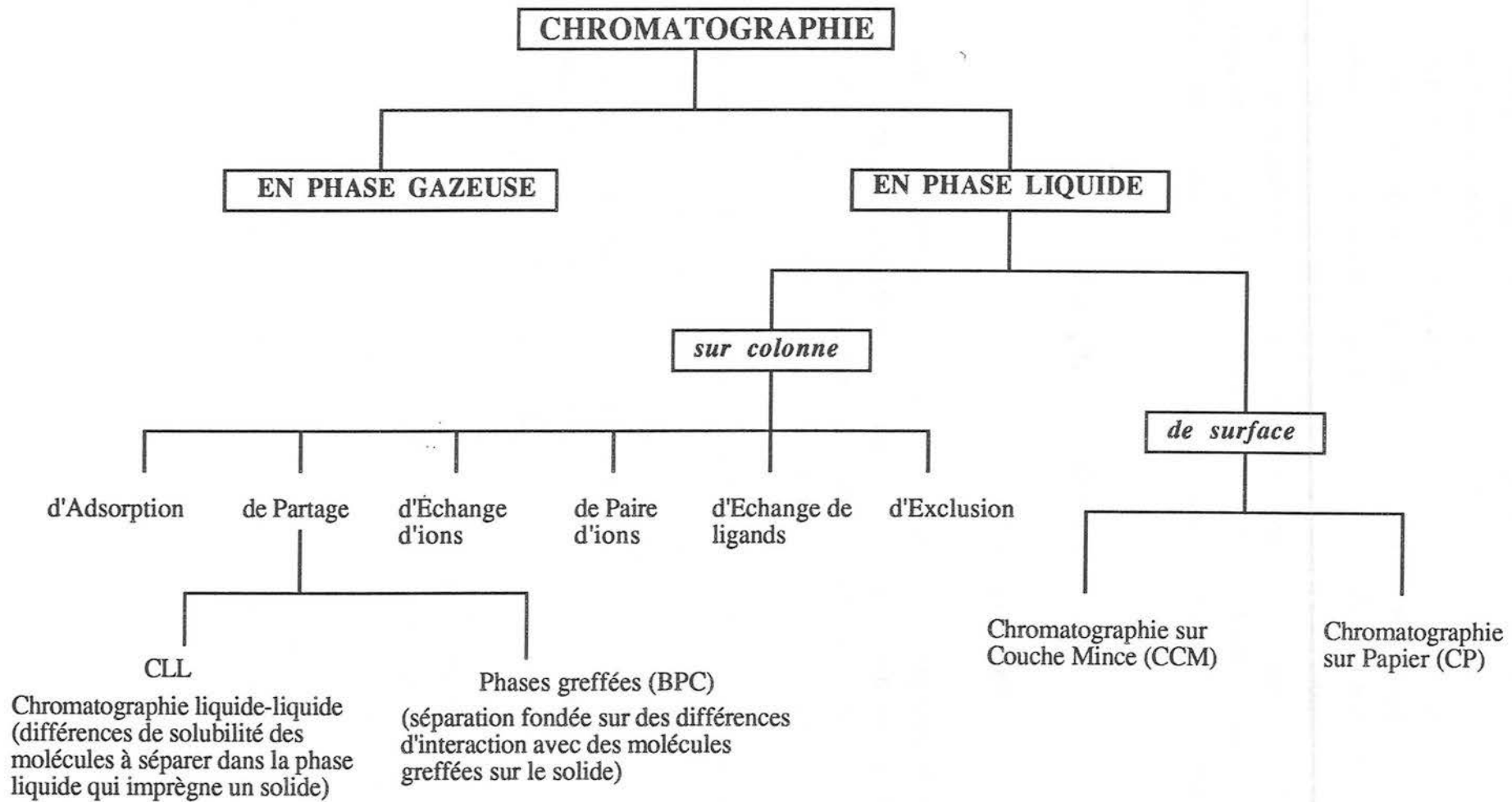


FIGURE III.1 : APERCU DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES.

Nous nous sommes interrogés sur le choix de la chromatographie liquide haute performance. Quels sont ses avantages par rapport à une autre technique très utilisée, la chromatographie en phase gazeuse ? Doit-on utiliser la chromatographie sur couche mince comme méthode complémentaire de la C.L.H.P ?

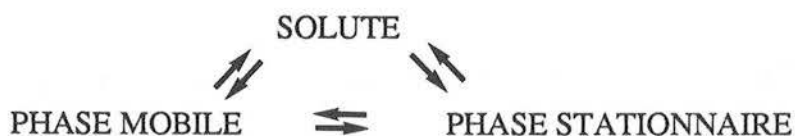
Comparaison avec la chromatographie en phase gazeuse :

La chromatographie en phase gazeuse a remporté de nombreux succès dans la séparation de mélange. Cependant, 20% seulement des substances chimiques sont justiciables de cette technique sans modification chimique préalable de l'échantillon. De ce fait, les limitations de la chromatographie en phase gazeuse recèlent trois cas :

- les substances peu volatiles, souvent de masse molaire supérieure à 300 g,
- les substances sensibles à une élévation de température, même modérée, ce qui est le cas de nombreux composés d'intérêt biologique,
- les substances ionisées, car elles sont en général très peu volatiles.

La chromatographie en phase liquide n'est limitée ni par la volatilité de l'échantillon ni par sa stabilité thermique. De plus, la chromatographie en phase liquide est plus efficace que la chromatographie en phase gazeuse dans le cas de séparations difficiles pour trois raisons:

- en plus des interactions du soluté avec la phase stationnaire, comme c'est le cas dans la chromatographie en phase gazeuse, en chromatographie en phase liquide celui-ci présente des interactions avec la phase mobile d'où des possibilités plus grandes rendant cependant la méthode plus complexe:



- les phases stationnaires sont plus variées en chromatographie en phase liquide qu'en chromatographie en phase gazeuse,

- la température est moins élevée en C.L.H.P qu'en chromatographie en phase gazeuse. Or les interactions moléculaires augmentent d'intensité lorsque la température diminue d'où l'intérêt d'opérer à basse température; généralement la chromatographie en phase liquide se pratique à température ambiante. Néanmoins, l'appareillage est plus complexe.

Comparaison avec la chromatographie sur couche mince :

La chromatographie en phase liquide bien que d'un coût beaucoup plus élevé que la chromatographie sur couche mince, présente par rapport à cette dernière de nombreux avantages :

- analyse quantitative facile
- reproductibilité améliorée
- automatisation possible
- séparations plus rapides
- transposition possible des séparations analytiques aux séparations préparatives
- les colonnes de chromatographie liquide sont réutilisables alors que les plaques de papier en chromatographie sur couche mince sont à usage unique.

Néanmoins, la chromatographie sur couche mince présente depuis quelques années un regain d'intérêt depuis l'amélioration du diamètre des particules de silice. Celles-ci sont actuellement très fines (5 à 10 μm) et permettent l'obtention de bonnes séparations.

C'est surtout une technique peu coûteuse, complémentaire de la C.L.H.P. En effet, des chromatogrammes qui apparaissent excellents et résolus à l'examen visuel ne le sont pas en réalité et inversement. Ainsi, une étude en C.C.M complétée par une C.L.H.P conforte souvent des résultats.

II.1.2 - LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

II.1.2.1 - Matériel et méthode

Nos analyses en chromatographie sur couche mince ont été faites sur feuilles d'aluminium recouvertes de Silica-gel 60F₂₅₄ de marque Merck® (ref : 5554), de 11 μm de granulométrie. Le solvant d'élution était composé d'un mélange benzène - chloroforme - éthanol absolu (3/2/1). Ce mélange permet des séparations correctes de nos composés. Les échantillons témoins ont été fournis par la société Sanofi (Ellipticine, ref:RD/6973 et hydroxy-9 ellipticine, ref:RDS/7092).

Le R_f ou "Rate factor" caractérisant la migration d'un soluté est défini par le rapport :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

Le dépôt de matière influence directement la qualité de la séparation et la précision des mesures effectuées ultérieurement. Aussi, ce dépôt doit-il être aussi faible que possible en surface et en quantité. Malheureusement, il n'était pas toujours possible lors de nos analyses de respecter ces consignes. Nos échantillons ont été déposés plusieurs fois à l'aide d'un capillaire. Les concentrations des solutions étaient de l'ordre de 10 à 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Après migration de nos échantillons dans une cuve contenant l'éluant et séchage de la plaque, nous procédons à l'observation des spots apparus sous lampe à rayons Ultra-violet à 254

ou 360 nm. La révélation des spots se fait par imprégnation de vapeurs d'iode en cuve fermée pendant quelques dizaines de secondes [46].

II.1.2.2 - Résultats

Les analyses effectuées en chromatographie sur couche mince montrent pour l'Ellipticine un spot unique très net, de couleur jaune, intense, dont le R_f est égal à 0,45. En revanche, des phénomènes intéressants affectent la 9-OH ellipticine. Nous constatons, en effet, l'apparition de trois spots sur la plaque de silice lorsque l'on fait un dépôt de 9-OH ellipticine en solution dans du méthanol. Les résultats montrent que le premier spot de surface, intense, a une couleur jaune-orangée ($R_f = 0,21$) tandis que le deuxième spot de très faible surface, jaune (révélé en rose par l'iode) à un R_f de 0,50. Le troisième spot, de faible surface, est de couleur rouge-carmin ($R_f = 0,65$).

Des essais effectués dans d'autres solvants que le méthanol pour cette même 9-OH ellipticine ont donné les résultats précisés dans le tableau III.1.

SOLVANT	NOMBRE DE SPOTS APPARUS
Acétate d'éthyle	2
Acétonitrile	2
Chloroforme	2
Diméthylformamide	3
Diméthylsulfoxyde	2
Méthanol	3

TABEAU III.1 : NOMBRE DE SPOTS OBTENUS LORS DE L'ANALYSE DE LA 9-HYDROXY ELLIPTICINE SELON SON SOLVANT DE DILUTION.

De façon à nous assurer de la pureté de ce produit, nous avons procédé à une étude par résonance magnétique nucléaire de cette 9-OH ellipticine sur un appareil dispersif Bruker®, le composé étant en suspension dans du DMSO deutérié.

Le spectre RMN (300 MHz) donne les résultats suivants (déplacements chimiques exprimés en ppm) : $\delta = 2,80$ (s,3H,CH₃-11); 3,20 (s,3H,CH₃-5); 7,02 (d,1H,J_{H7-H8} = 8,5 Hz,H-8); 7,40 (d,1H,J_{H7-H8} = 8,5Hz,H-7); 7,80 (d,1H,J_{H10-H8} = 2Hz,H-10); 7,92 (d,1H,J_{H3-H4} = 5Hz,H-4); 8,44 (d,1H,J_{H3-H4} = 5Hz,H-3); 9,12 (s,1H,NH); 9,68 (s,1H,H-1); 11,08 (s,1H,OH).

Ce spectre est en accord avec les données décrites par Dat-Xuong et al.[3].

On constate donc en C.C.M que notre composé 9-hydroxylé est très facilement dégradé quel que soit le solvant. D'après la bibliographie déjà indiquée, il est relativement logique de penser à la formation d'une quinone-imine. En effet, les solvants commercialisés ne sont jamais très purs et contiennent de plus une quantité non négligeable d'oxygène dissous. Ces éléments tendent à accréditer l'hypothèse d'une oxydation de la 9-OH ellipticine dans ces solvants. Il faut néanmoins rester prudent et tenter d'étudier plus avant ces phénomènes d'oxydation *in vitro*.

L'analyse de l'Ellipticinium et du 9-OH ellipticinium ne montre aucune migration de ces composés sur la plaque chromatographique.

Nous avons poursuivi l'analyse qualitative sur nos essais de bioconversion par cette méthode. Sur des essais effectués soit en erlenmeyers, soit en fermenteur, on constate l'apparition de nombreux spots sur la plaque chromatographique :

- un premier spot apparaît, de couleur rose orangée, de très faible intensité, nettement visible par observation sous Ultra-violet dont le R_f est de 0,21, identique à celui de la 9-OH ellipticine;
- puis, on observe un spot de couleur rose ($R_f = 0,30$);
- un spot de couleur jaune ($R_f = 0,45$) attribuable à l'Ellipticine;
- d'autres spots apparaissent de R_f 0,55 (rose-violet), 0,60 (brun), 0,65 (rouge), 0,73 (jaune). Au dessus d'un R_f de 0,73, quelques spots mal définis et migrant pratiquement avec le front de solvant sont visibles.

Cette observation suscite plusieurs questions : peut-on attribuer chaque tache à un produit issu d'une bioconversion ou bien peut-on considérer, comme nous l'avons déjà vu, que la 9-OH ellipticine se dégrade en plusieurs sous-produits dont la plupart, ou tous, apparaîtraient sur cette plaque ? Certains spots peuvent-ils correspondre à des composés issus de notre système fongique après extraction et n'ayant aucun lien avec la 9-OH ellipticine ou avec un produit issu d'une bioconversion ?

On remarque néanmoins la présence d'Ellipticine résiduelle, ainsi qu'une faible quantité de 9-OH ellipticine. Cette faible concentration rend beaucoup plus difficile sa détection.

Ces résultats confirment les limites de ce système analytique même si l'utilisation de plaques chromatographiques à haute résolution a nettement amélioré les analyses. Nous allons donc compléter ces résultats par une deuxième méthode analytique : la chromatographie liquide haute performance.

III.1.3 - LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

La chromatographie en phase liquide a fait l'objet de nombreuses publications concernant l'analyse de l'Ellipticine et de ses dérivés dont nous ne citerons que les plus importantes [47,145,146,148]. Différentes conditions opératoires ont été mises au point. Néanmoins, il existe une certaine uniformité des matériels et conditions utilisés : colonne, longueur d'onde de détection en Ultra-violet (254 ou 313 nm), composition de la phase mobile et débit de cette phase.

III.1.3.1 - Matériel et méthode

Le système analytique chromatographique utilisé est une chaîne Waters® comprenant deux pompes modèle 501, un mélangeur, une vanne d'injection de type U6K, un détecteur Ultra-violet à longueur d'onde variable de type λ max modèle 481 et un intégrateur de type 745 Pak module. La colonne choisie pour nos essais est une colonne en silice greffée en phase inverse provenant également de chez Waters® de type μ Bondapak C18 (30 cm x 3,9 mm) de 10 μ m de granulométrie (ref: P/N 27324). Le choix de cette colonne est fondé, d'une part sur les multiples essais effectués sur différentes colonnes, et d'autre part sur le fait que la bibliographie ne mentionne que ce type de colonne pour les analyses. La comparaison des résultats n'en sera que plus aisée.

Nos conditions opératoires sont les suivantes, déterminées expérimentalement et coïncidant souvent avec celles décrites dans la littérature mais comportant cependant quelques différences [145-148]:

- Phase mobile : méthanol - eau (75/25 v/v) contenant $5 \cdot 10^{-2}$ M.l⁻¹ d'acétate d'ammonium et ajustée à pH = 6 par une solution à 5% d'acide acétique. La présence des sels permet de stabiliser la molécule sur la phase stationnaire de la colonne. Nous reviendrons ultérieurement sur ce point.

- Débit de la phase mobile : 1,8 ml.min⁻¹.

- Longueur d'onde de détection : 293 nm. Après passage au spectrophotomètre, nous avons trouvé cette longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption de l'Ellipticine et de son dérivé 9-hydroxylé. Dans les publications, on remarque souvent une longueur d'onde de 313 nm, parfois de 254 nm. Nous nous situons donc entre les deux et nous avons procédé, en plus, à une détection simultanée à 308 nm, longueur d'onde utilisée en purification industrielle.

- Quantité d'échantillon introduite : 10 μ l. L'échantillon injecté provient d'une extraction préalable et est solubilisé dans du méthanol comme les solutions témoins. Nous n'avons pas utilisé de pré-colonne ou de filtre pour la "préparation" de l'échantillon, bien que cela soit recommandé pour éviter une dégradation trop rapide de la colonne. Après quelques mesures, nous avons constaté des pertes de concentration des substances introduites allant jusqu'à 25% lorsque l'on utilisait un filtre ou une pré-colonne. Il est simplement nécessaire de veiller à un nettoyage régulier du filtre de tête de colonne.

- Chromatogrammes obtenus : L'intégrateur, connecté sur la sortie 1V du détecteur, est calibré pour obtenir un signal en mV pleine échelle, correspondant au millième d'absorbance. En règle générale, nous nous sommes situés entre 0,008 et 0,12 unités d'absorbance.

Les produits standards utilisés sont les mêmes que ceux utilisés pour la C.C.M et fournis par la société Sanofi. Les masses molaires, en grammes, de ces composés sont respectivement de 246 et 262 pour l'Ellipticine et la 9-OH ellipticine.

De la même façon qu'en C.C.M, on a déterminé un R_f caractéristique d'un soluté, on définit en C.L.H.P un temps de rétention t_R correspondant au temps d'élution au maximum du pic.

Nous avons injecté des concentrations connues des produits témoins puis avons déterminé les surfaces des pics correspondants exprimées en unités arbitraires. Pour nos calculs nous prendrons par convention $\times 10^5$ unités arbitraires. La relation qui s'établit entre les quantités injectées et les aires des pics permet d'obtenir une droite étalon à partir de laquelle on pourra déterminer expérimentalement des concentrations inconnues de substrat.

III.1.3.2 - Résultats et discussion

Comme en C.C.M, nous avons procédé à une analyse d'échantillons témoins avant de procéder à l'analyse qualitative et quantitative sur des essais de bioconversion réalisés au laboratoire.

a) Gamme d'étalonnage sur les produits témoins

La gamme étalon a été établie avec les échantillons solubilisés en méthanol. La Figure III.2 présente un chromatogramme obtenu lors de l'injection des produits témoins sur la colonne.

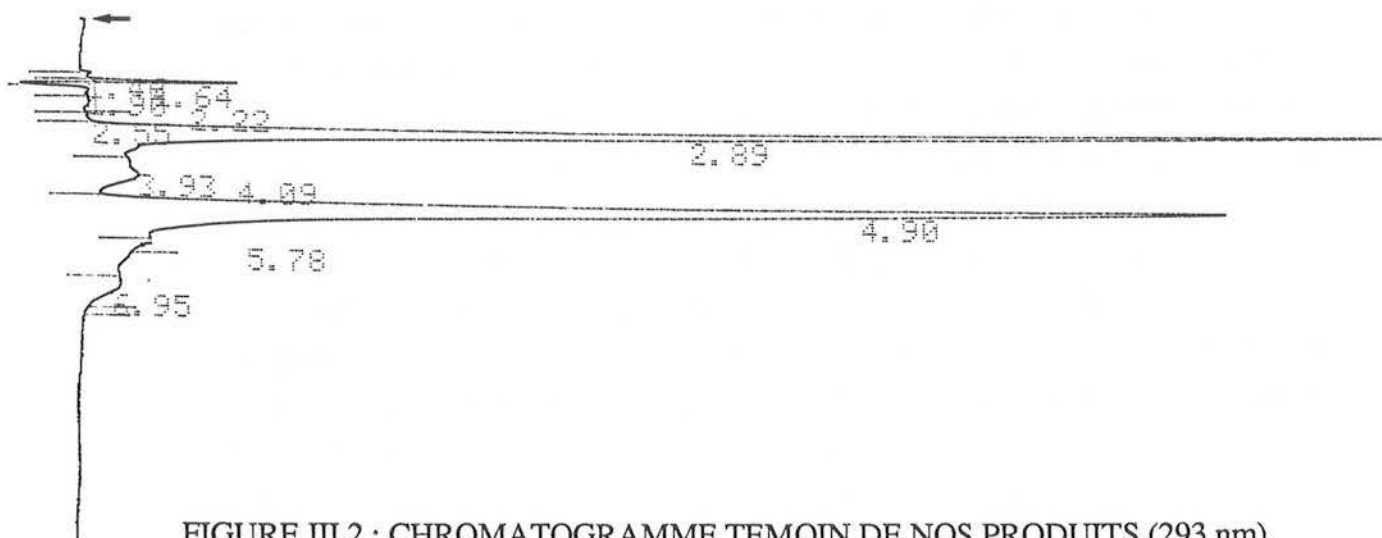


FIGURE III.2 : CHROMATOGRAMME TEMOIN DE NOS PRODUITS (293 nm).

La présence de sels dans la phase mobile permet la stabilisation de nos composés. Après avoir effectué une petite étude sur la composition de la phase mobile, nous avons observé que l'absence de sels dans une phase mobile contenant du méthanol provoque l'apparition de deux pics pour la 9-OH ellipticine témoin. Si l'on récupère séparément les fractions éluées correspondant aux pics et que l'on réinjecte une aliquote de ces fractions, on obtient encore deux pics par fraction. Les temps de rétention sont strictement identiques à ceux initialement obtenus. On peut se demander si les conditions opératoires ainsi que la nature de la phase stationnaire ne sont pas à l'origine d'un tel phénomène : toutes les colonnes chromatographiques sont de nature oxydante (présence de chlorures dans la silice greffée) et peuvent contribuer à la dégradation d'un composé tel que la 9-OH ellipticine, facilement oxydable. Un spectre électronique du deuxième pic apparu pour chaque injection montre, outre l'absorption à 293 nm, une absorption à 493 nm dans le domaine du rouge. Ceci confirme la formation d'un produit d'oxydation de la 9-OH ellipticine au sein de cette colonne et dans nos conditions opératoires ainsi que l'utilité de mettre des sels dans la phase mobile.

On note aussi que les t_R sont relativement variables au cours du temps sans cependant affecter les aires des pics obtenus. Cela peut être imputable au vieillissement de la colonne qui devient moins éluvative et à des phénomènes d'équilibre de la colonne avec une phase mobile comportant des sels. Les perturbations résultantes seraient le fait de désorption ou d'adsorption d'une partie ou de la totalité des composés de la phase mobile qui étaient auparavant adsorbés sur la phase stationnaire [149]. L'injection de témoins quotidiens est donc nécessaire.

La Figure III.3 présente la droite d'étalonnage obtenue pour l'Ellipticine et la 9-OH ellipticine à 293 nm. La proportionnalité concentration des produits - aire des pics est parfaitement respectée jusqu'à $20 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ et très acceptable pour les valeurs supérieures.

Puisque la littérature mentionnait des longueurs d'onde différentes de celle que nous avons choisie, nous avons comparé l'absorbance de nos produits témoins à différentes longueurs d'onde. Les Figures III.4A et 4B présentent les droites étalon obtenues à $\lambda = 254, 293, 308$ et 493 nm .

On constate que l'Ellipticine présente une absorption linéaire en fonction de la concentration pour des longueurs d'onde de 254 et surtout 293 nm. La 9-OH ellipticine montre une linéarité intéressante et une meilleure sensibilité à $\lambda = 293 \text{ nm}$. On remarque donc que la longueur d'onde choisie permet une détection optimale des deux composés pour une gamme de concentration inférieure à $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.

La gamme d'étalonnage de la 9-OH ellipticine, effectuée à $\lambda = 493 \text{ nm}$, montre une absorbance et confirme l'apparition de produits, probablement oxydés, dans la solution alcoolique.

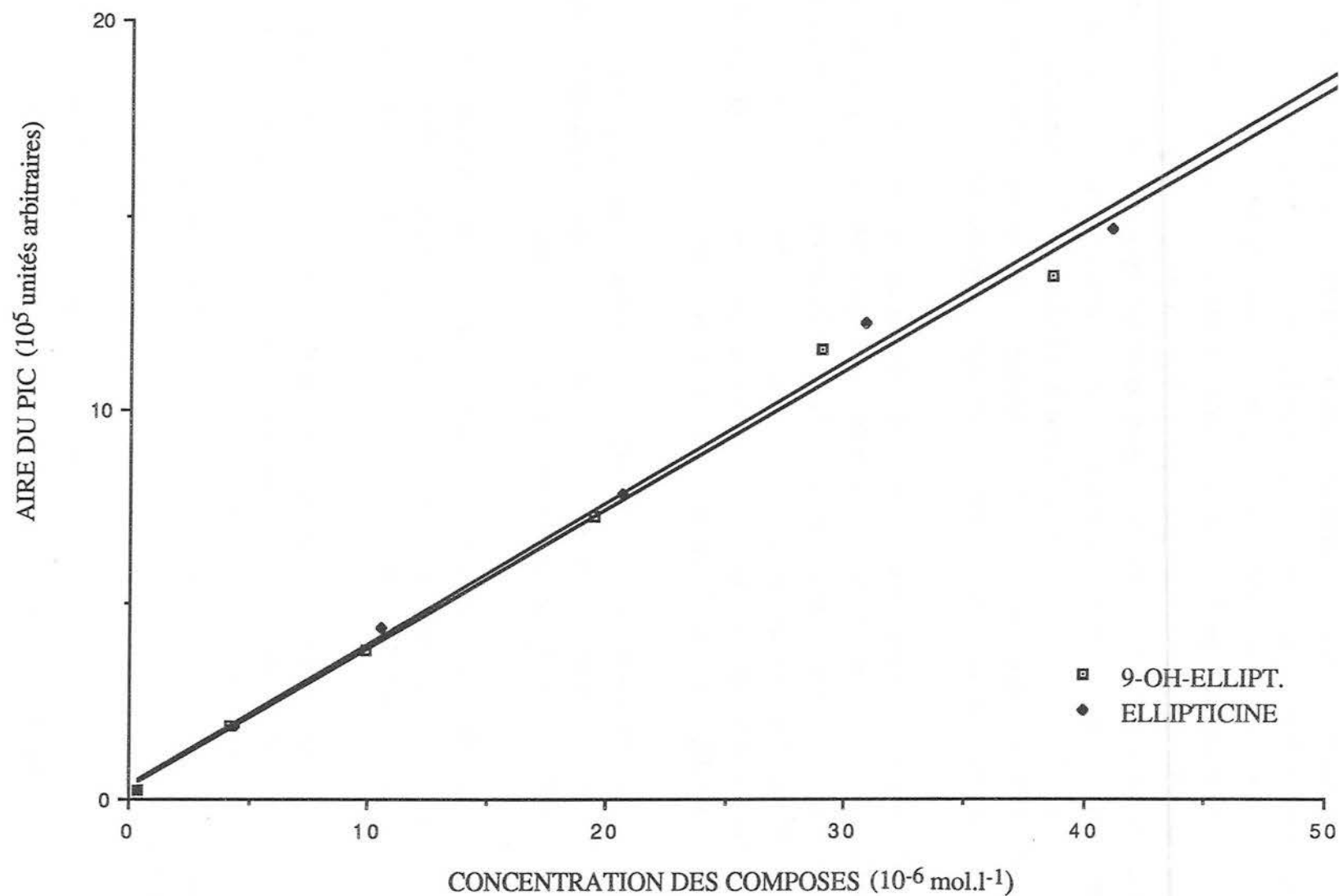


FIGURE III.3 : GAMME ETALON DES COMPOSES TEMOINS A 293 nm (en solution dans le méthanol).

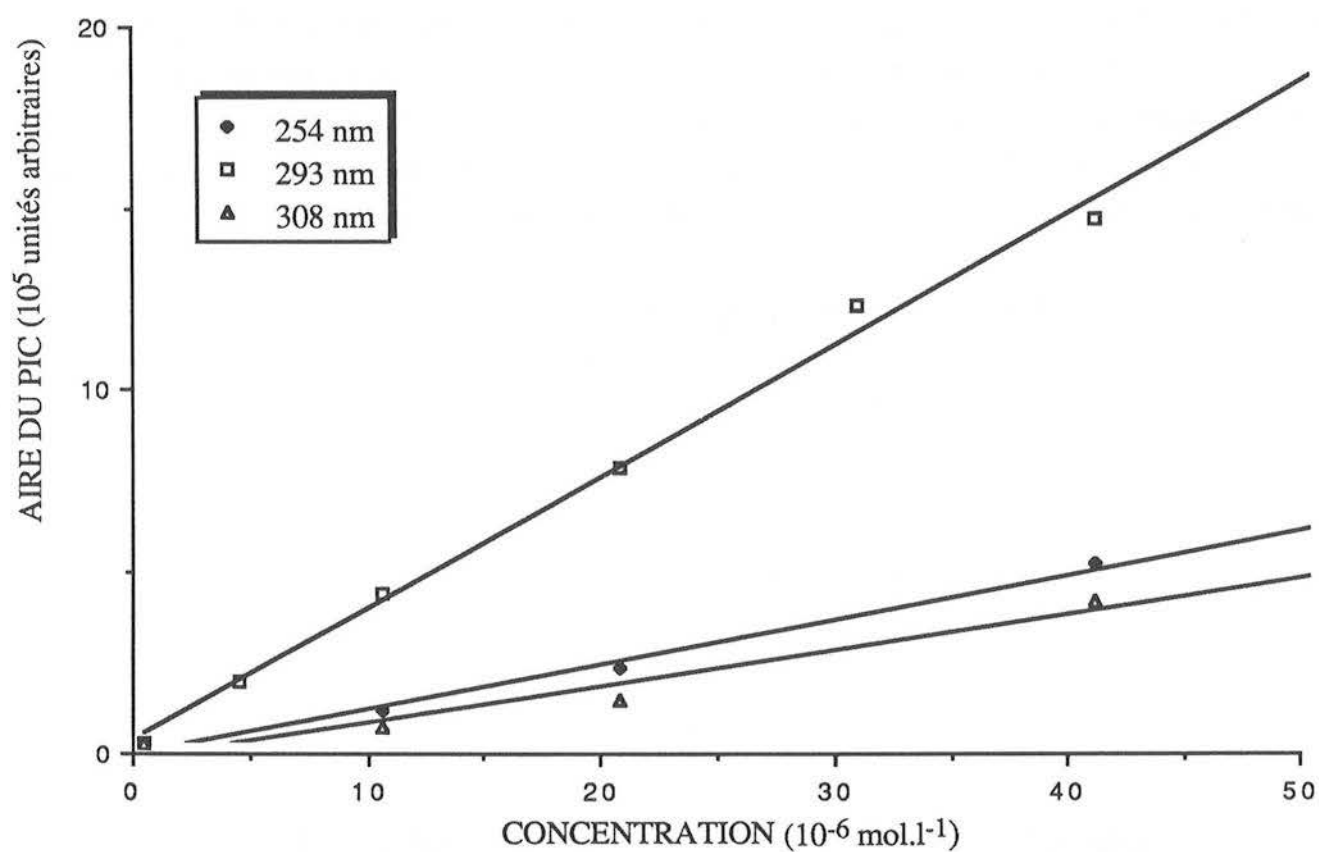


FIGURE III.4A : ABSORBANCE COMPAREE DE L'ELLIPTICINE.

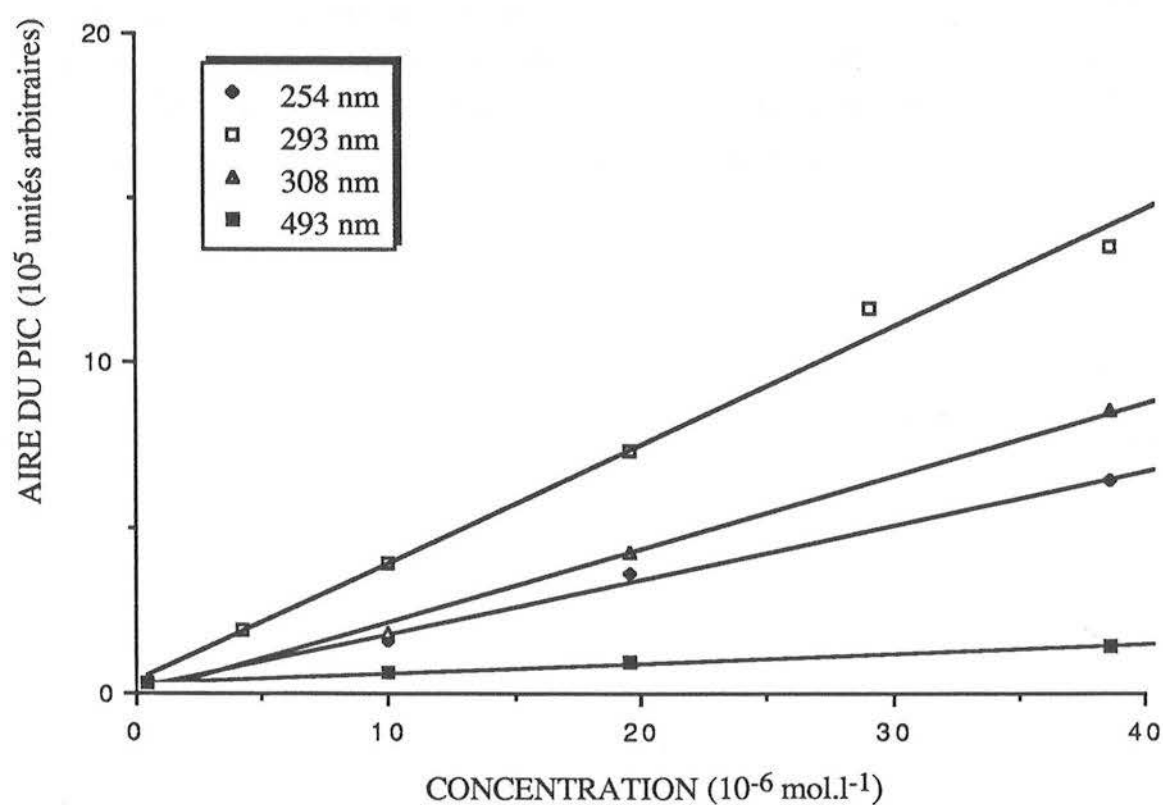


FIGURE III.4B : ABSORBANCE COMPAREE DE LA 9-OH ELLIPTICINE.

Afin de vérifier que l'Ellipticinium et la 9-hydroxy ellipticinium n'interféraient pas avec nos analyses, nous avons effectué une injection témoin dont les résultats montrent deux pics de t_R 2,5 et 3,7. Ces substances n'interfèrent pas avec nos mesures et on ne devrait pas retrouver ces pics lors de nos analyses puisque nous ne mettons pas d'Ellipticinium dans nos solutions.

Il faudrait vérifier cependant que lors de nos essais d'extraction nous ne formons pas de dérivés quaternisés. Nous reviendrons sur ce point lors de l'étude de l'extraction.

b) Résultats sur les essais de bioconversion

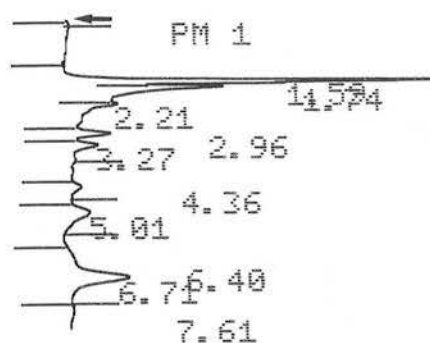


FIGURE III.5A : CHROMATOGRAMME TEMOIN DU MILIEU DE CULTURE
EXTRAIT (293 nm).

La figure III.5A montre que le témoin d'extraction du milieu seul sans substance présente un léger bruit de fond. Cependant il s'agit de traces résiduelles émanant de la colonne car ce bruit de fond s'atténue avec les essais successifs. Néanmoins, pour plus de rigueur on ne considérera, lors de nos analyses, que les pics dont la surface sera supérieure à $0,1 \cdot 10^5$ unités arbitraires de surface. La figure III.5B présente un chromatogramme réalisé après un essai de bioconversion.

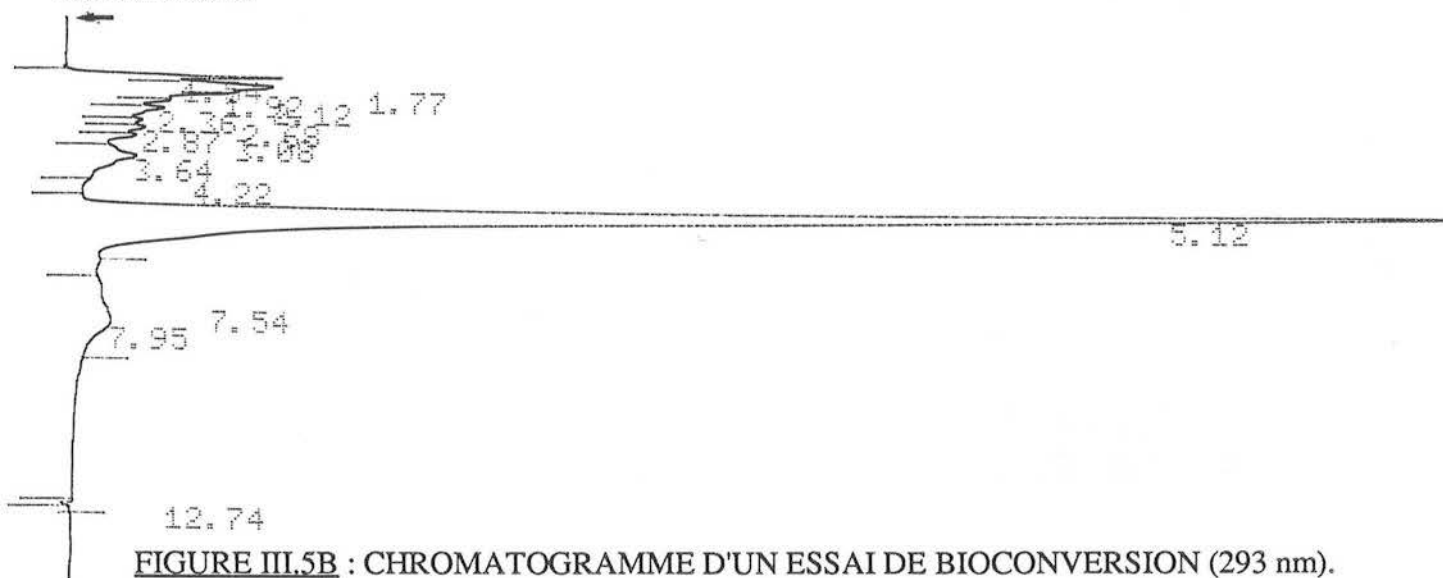


FIGURE III.5B : CHROMATOGRAMME D'UN ESSAI DE BIOCONVERSION (293 nm).

On constate l'apparition d'une multitude de pics. Nous ne savons donc pas à quels produits, issus ou non d'une bioconversion, nous avons affaire. Aussi nous sommes-nous attachés à identifier les produits formés.

III.2 - LES DERIVES DE LA 9-HYDROXY ELLIPTICINE

Nous avons déjà parlé du problème de dégradation de la 9-hydroxy ellipticine au sein de l'organisme humain en plusieurs dérivés probablement toxiques (cf. chapitre I). Les premiers résultats tirés des analyses effectuées en chromatographie sur couche mince et en chromatographie en phase liquide nous ont incités à étudier d'une façon plus détaillée ce phénomène *in vitro*.

III.2.1 - DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

Nous ne rappellerons pas ce qui a déjà été décrit, mais nous nous attarderons sur ce qui a été publié récemment sur ce phénomène d'oxydation de la 9-hydroxy ellipticine *in vitro*.

Depuis quelques années, des travaux de recherche ont montré que l'oxydation quasi-spontanée du dérivé 9-hydroxylé dans certains milieux aqueux et organiques *in vitro*, provoquait la formation facile et rapide de 9-oxo ellipticine. En effet, Meunier et al [37] ont rapporté récemment la formation du produit 9-oxydé, stable, par action de la Horse Radish Peroxidase (HRP) en présence de peroxyde d'hydrogène et en milieu aqueux sur le composé 9-hydroxylé. Auclair et al [36] propose une dimérisation par action de la 9-OH ellipticine sur la 9-oxo ellipticine produite par oxydation du dérivé 9-hydroxylé à l'aide d'un anion superoxyde. Le site C10 du système hétérocyclique de la quinone-imine est très réactif puisqu'il réagit avec des nucléophiles variés aussi bien en milieu aqueux [38] qu'en milieu organique [73]. Dernièrement, un mécanisme d'oxydation et de dimérisation a été proposé [40,41].

On constate donc que l'hydroxy-9 ellipticine est un produit facilement oxydable et instable lorsqu'elle est mise en solution dans un solvant organique.

III.2.2 - OBTENTION DE DÉRIVÉS DE LA 9-HYDROXY ELLIPTICINE

Afin d'étudier correctement les réactions de dégradation, il nous fallait disposer des produits dont il est, *a priori*, logique de penser qu'ils doivent être formés par ces réactions. Ainsi, en collaboration avec Mr Pautet du laboratoire de Chimie Organique de l'U.E.R de Pharmacie de L'Université Lyon I, nous avons pu obtenir quelques dérivés.

Les spectres Infra-rouge ont été obtenus sur un appareil dispersif Perkin-Elmer® 683.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été effectués sur un appareil Bruker® 300 MHz utilisant le TMS comme standard interne.

III.2.2.1 - La 9-oxo ellipticine

A une solution de 20 mg de 9-OH ellipticine (76.10^{-3} mmole) dans 50 ml de chloroforme placée sous agitation magnétique, sont ajoutés 32 mg de dioxyde de manganèse (38.10^{-2} mmole). Très rapidement, le milieu réactionnel prend une coloration rouge. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince de silice avec l'éluant précédemment défini (cf. § III.1.2).

On obtient une tache jaune révélée en rose par l'iode dont le R_f est de 0,21 et correspondant à la 9-hydroxy ellipticine et une tache rouge de $R_f = 0,65$ correspondant à la quinone-imine ou 9-oxo ellipticine.

Après 30 minutes de réaction, il ne reste plus de 9-hydroxy ellipticine dans le milieu réactionnel et seule subsiste la tache rouge ($R_f = 0,65$). La séparation de la 9-oxo ellipticine du milieu réactionnel est réalisée par chromatographie sur silice (Silice-Amicon Si 60). Le milieu réactionnel est évaporé à sec et repris par 2 ml du même mélange éluant. La colonne de silice a une longueur de 10 cm pour un diamètre de 1cm. La fraction colorée en rouge est recueillie. Après évaporation du solvant, on récupère 18 mg de produit rouge. Après séchage au dessiccateur sous vide, les données spectrales confirment la structure de type 9-oxo ellipticine.

Le rendement est de 90%.

Le spectre Infra-rouge (KBr) donne pour C=N et C=C, 1600 cm^{-1} tandis que pour C=O, on obtient 1635 cm^{-1} .

Le spectre RMN (300 MHz) (CDCl_3) donne les résultats suivant (déplacements chimiques exprimés en ppm) : $\delta = 2,75$ (s, 3H, CH_3 -5); 2,79 (s, 3H, CH_3 -11); 6,46 (d, 1H, $J_{\text{H}7-\text{H}8} = 9\text{ Hz}$, $J_{\text{H}8-\text{H}10} = 1\text{ Hz}$, H-8); 6,80 (s, 1H, H-10); 7,41 (d, 1H, $J_{\text{H}7-\text{H}8} = 10\text{ Hz}$, H-7); 7,73 (d, 1H, $J_{\text{H}3-\text{H}4} = 6\text{ Hz}$, H-4); 8,62 (d, 1H, $J_{\text{H}3-\text{H}4} = 6\text{ Hz}$, H-3) et 9,37 (s, 1H, H-1).

Les déplacements sont en accord avec ceux décrits dans la littérature [150].

Il est également possible d'obtenir ce dérivé par l'action d'autres oxydants.

III.2.2.2 - Autres produits

Nous avons pu obtenir des dérivés quinone-imine mono ou di-méthoxylés en position 10. Ces produits ont été réalisés dans un but de comparaison qualitative.

La méthode utilisée par Kansal et al. [73] qui consiste à oxyder la 9-OH ellipticine par l'oxygène en présence de chlorure cuivreux et de pyridine n'ayant pas donné de résultats, nous avons traité directement la 9-oxo ellipticine par le méthylate de sodium en solution dans le méthanol.

20 mg de sodium sont introduits dans 5 ml de méthanol pur. A une solution préparée à partir de 15 mg de 9-oxo ellipticine et de 5 ml de dichlorométhane, on ajoute goutte à goutte la solution de méthylate de sodium. L'évolution du milieu réactionnel est suivie par C.C.M dans l'éluant habituel. L'addition est arrêtée lorsque la 9-oxo ellipticine est totalement transformée. Après concentration, le milieu est analysé par chromatographie préparative sur couche mince (plaque de silice S₆₀, 20 x 20 cm, épaisseur 0,5 mm, Merck®) avec le même éluant.

Quatre bandes sont visibles :

- F1 : intense, de couleur jaune, R_f = 0,21
- F2 : faible, de couleur rose pâle, R_f = 0,30
- F3 : intense, de couleur orange, R_f = 0,46
- F4 : faible, de couleur violette, R_f = 0,68

Après récupération, la silice est extraite pour F1 et F2 par l'acétone et pour F3 et F4 par le chloroforme. Nous avons ensuite procédé à la caractérisation spectrale des produits :

- F1 = 9-OH ellipticine,
- F2 = 9-OH, 10-OCH₃ ellipticine,
- F3 = 9=O,10,10-di-OCH₃ ellipticine,
- F4 = 9=O,10-OCH₃ ellipticine.

Les spectres RMN (300 MHz) de ces composés sont les suivants (les déplacements chimiques sont exprimés en ppm).

- 9-OH,10-OCH₃ ellipticine (en solution dans du CD₃COCD₃): δ = 2,75 (s,3H,CH₃-11); 3,56 (s,3H,CH₃-5); 3,93 (s,3H,OCH₃); 7,17 (d,1H,J_{H7-H8} = 10Hz,H-8)*; 7,22 (d,1H,J_{H7-H8} = 10Hz,H-7)*; 7,90 (d,1H,J_{H3-H4} = 6Hz,H-4); 8,44 (d,1H,J_{H3-H4} = 6Hz,H-3); 9,70 (s,1H,H-1); 10,2 (s,1H,NH); 11 (s,1H,OH).

Remarque : les mesures notées * constituent un système AB (deux raies centrales intenses accompagnées de deux raies faibles).

- 9=O,10,10-di-OCH₃ quinone imine (en solution dans du CDCl₃): δ = 2,74 (s,3H,CH₃-11); 3,28 (s,3H,OCH₃-10,OCH₃-10,CH₃-5)**; 3,30 (s,6H,OCH₃-10,OCH₃-10,CH₃-5)**; 6,24 (d,1H,J_{H7-H8} = 10Hz,H-8); 7,48 (d,1H,J_{H7-H8} = 10Hz,H-7); 7,75 (d,1H,J_{H3-H4} = 6,3Hz,H-4); 8,37 (d,1H,J_{H3-H4} = 6,3Hz,H-3); 9,06 (s,1H,NH); 9,68 (s,1H,H-1).

Remarque : on observe une trace de dérivé mono-méthoxy en position 10. Il y a présence d'un faible signal à δ = 4,21 ppm. Les mesures notées ** présentent l'attribution d'un signal difficile à établir. Les déplacements des deux OCH₃ en C₁₀ sont en accord avec la littérature : δ = 3,36 et 3,23 ppm (CDCl₃) [73].

- 9=O,10-OCH₃ quinone imine (en solution dans du DMSO): δ = 2,65 (s,3H,CH₃-11); 2,95 (s,3H,CH₃-5); 4,15 (s,3H,OCH₃); 6,57 (d,1H,J_{H7-H8} = 10Hz,H-8); 7,54 (d,1H,J_{H7-H8} = 10Hz,H-7); 7,93 (d,1H,J_{H3-H4} = 4Hz,H-4); 8,63 (d,1H,J_{H3-H4} = 4Hz,H-3); 9,45 (s,1H,H-1).

Le déplacement de OCH₃ est en accord avec la littérature : δ = 4,21 ppm (CDCl₃) [73].

De plus, nous avons procédé à une caractérisation chimique des produits obtenus.

F1 : produit chromatographiquement pur révélé en rose par l'iode. Lorsque ce produit est traité par MnO₂, il donne une tache rouge de R_f = 0,65 identique à celle d'un échantillon de 9-oxo ellipticine.

F2 : produit chromatographiquement pur révélé en rose par l'iode. Lorsqu'il est traité par MnO₂, il donne une tache violette de R_f = 0,68 identique à celle de F4.

Le traitement de F1 et F2 fait en parallèle montre bien la différence entre les deux quinone-imines.

F3 : produit chromatographiquement impur qui comporte toujours un peu de F4. Ce produit donne F4 par hydrolyse.

F4 : produit chromatographiquement pur.

III.2.3 - ETUDE DE LA REACTION DE DEGRADATION DE LA 9-HYDROXY ELLIPTICINE

Nous avons vu dans le paragraphe III.1.2 que le dérivé 9-hydroxylé de l'Ellipticine est instable en milieu organique polaire. Afin d'étudier ces réactions de dégradation, nous avons soumis la 9-OH ellipticine à un milieu oxydant de façon à suivre l'évolution de ces réactions par colorimétrie.

III.2.3.1 - Essai de quantification par colorimétrie

Nous avons constaté que l'addition d'un oxydant tel que l'hypochlorite de sodium dans une solution alcoolique de 9-hydroxy ellipticine provoque l'apparition d'une couleur rouge-brique spécifique. Cette teinte est assez stable pour être analysée en spectrophotométrie. La quantification de cette réaction est de ce fait réalisable par colorimétrie.

III.2.3.2.1 - Matériel et méthode

Les solutions d'hypochlorite de sodium sont préparées par dilution de liqueur commerciale et dosées par iodométrie. Les solutions de permanganate de potassium et de fer ferreux sont préparées à partir de produits commerciaux. Le colorimètre est un spectrophotomètre KONTRON de type Uvikon 860, les cuves utilisées sont en quartz et ont une épaisseur de un centimètre. Les spectres Infra-rouge ont été obtenus sur un appareil dispersif PERKIN-ELMER 683, les composés étant en suspension dans du nujol.

La méthodologie de dosage est la suivante: à une solution organique d'Ellipticine ou/et de son dérivé 9-hydroxylé, sont ajoutés quelques dizaines de microlitres d'une solution aqueuse diluée oxydante. La teinte jaune de départ vire immédiatement au rose brique. La couleur rose s'accroît pendant cinq minutes puis décroît pour disparaître au bout de plusieurs heures.

III.2.3.2.2 - Résultats

Nous avons étudié systématiquement tous les paramètres pouvant intervenir dans la réaction de coloration de façon à vérifier sa spécificité et à déterminer les conditions opératoires optimales.

a) Spectres d'absorption moléculaire

Les spectres d'absorption dans les domaines de l'ultraviolet et du visible de l'Ellipticine et de la 9-hydroxy ellipticine sont représentés en Figure III.6. Nous pouvons vérifier la présence des bandes E du système aromatique vers 200 nm ainsi que la bande B à structure fine dans le cas de l'Ellipticine vers 300 nm. Lorsque cette dernière est hydroxylée, la présence du constituant auxochrome entraîne un déplacement bathochrome de la bande B alors que sa structure fine s'estompe comme cela a été montré à de nombreuses reprises [151]. De plus, nous remarquons l'existence d'une bande peu intense à la limite de l'ultraviolet et du visible, ce qui explique la coloration jaune des solutions.

Lorsque le dérivé 9-substitué est mis en présence d'hypochlorite de sodium, il apparaît une teinte rose-orangée; les spectres électroniques sont représentés sur la Figure III.7. A l'examen de ces spectres, nous remarquons l'absorption par le dérivé 9-substitué d'une radiation à 490 nm correspondant au domaine du bleu/vert dans le visible. Lorsque le composé 9-hydroxylé est mis en présence de l'oxydant et de l'Ellipticine (rapport 1:1), il n'y a pas de réaction concurrente puisque l'absorbance reste identique. Les paramètres des différentes bandes d'absorption figurent dans le Tableau III.2.

Nous avons choisi la longueur d'onde de 490 nm correspondant à l'absorption maximale pour effectuer tous nos dosages quantitatifs.

b) Cinétique de la réaction

La coloration rose intervenant entre l'hydroxy-9 ellipticine et un oxydant n'est pas stable dans le temps. La Figure III.8 montre que la mesure de l'absorbance doit se faire 5 minutes après l'addition de l'hypochlorite de sodium pour obtenir la valeur maximale, donc un dosage quantitatif optimum. La décroissance de l'intensité de la coloration peut être expliquée par l'instabilité du produit de réaction. Par la suite, tous les résultats seront donnés pour le maximum de l'absorbance.

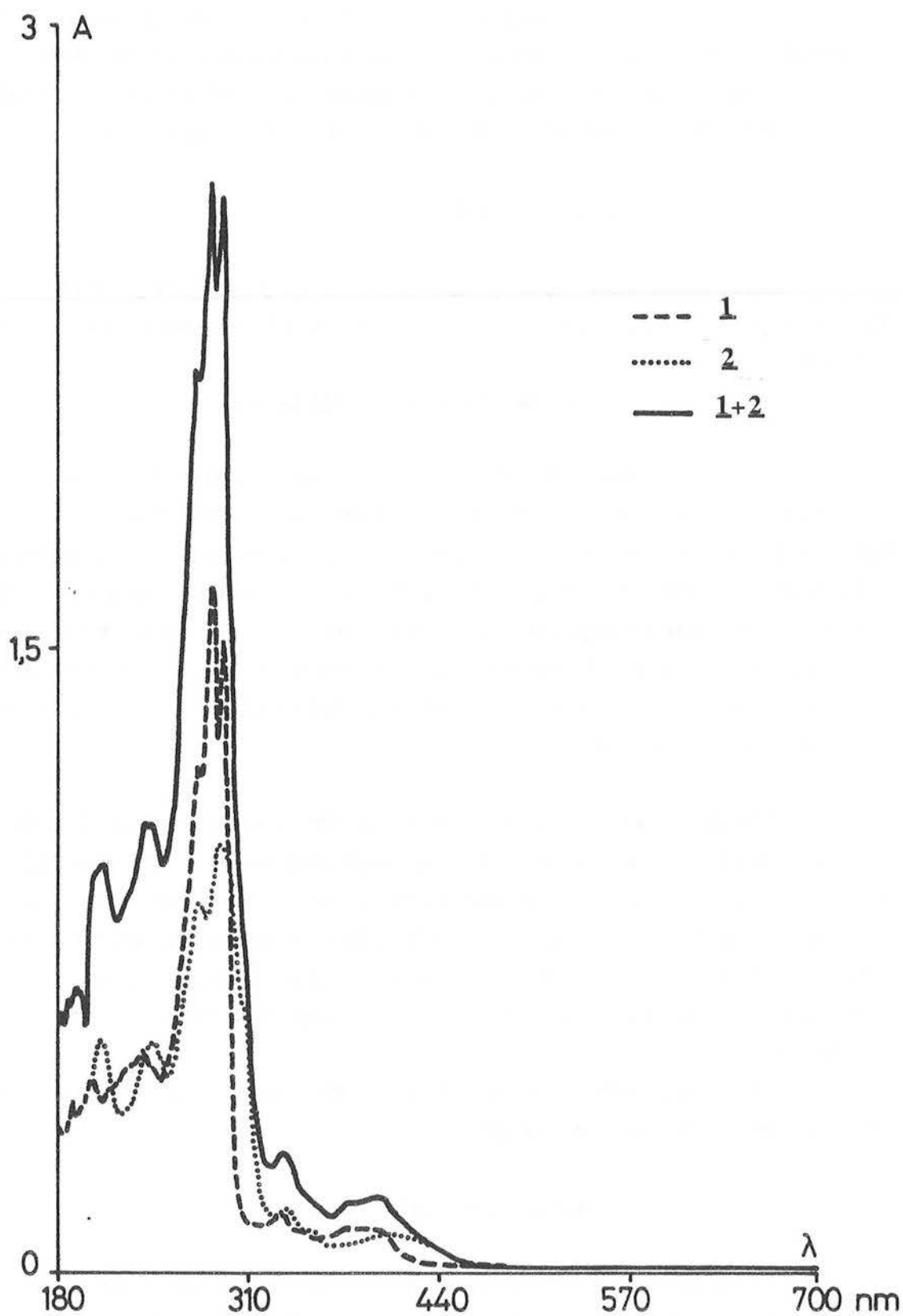


FIGURE III.6 : SPECTRE D'ABSORPTION DES SOLUTIONS TEMOINS.
(1 = ELLIPTICINE, 2 = 9-OH ELLIPTICINE EN SOLUTION DANS DU
METHANOL PUR A LA CONCENTRATION DE $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

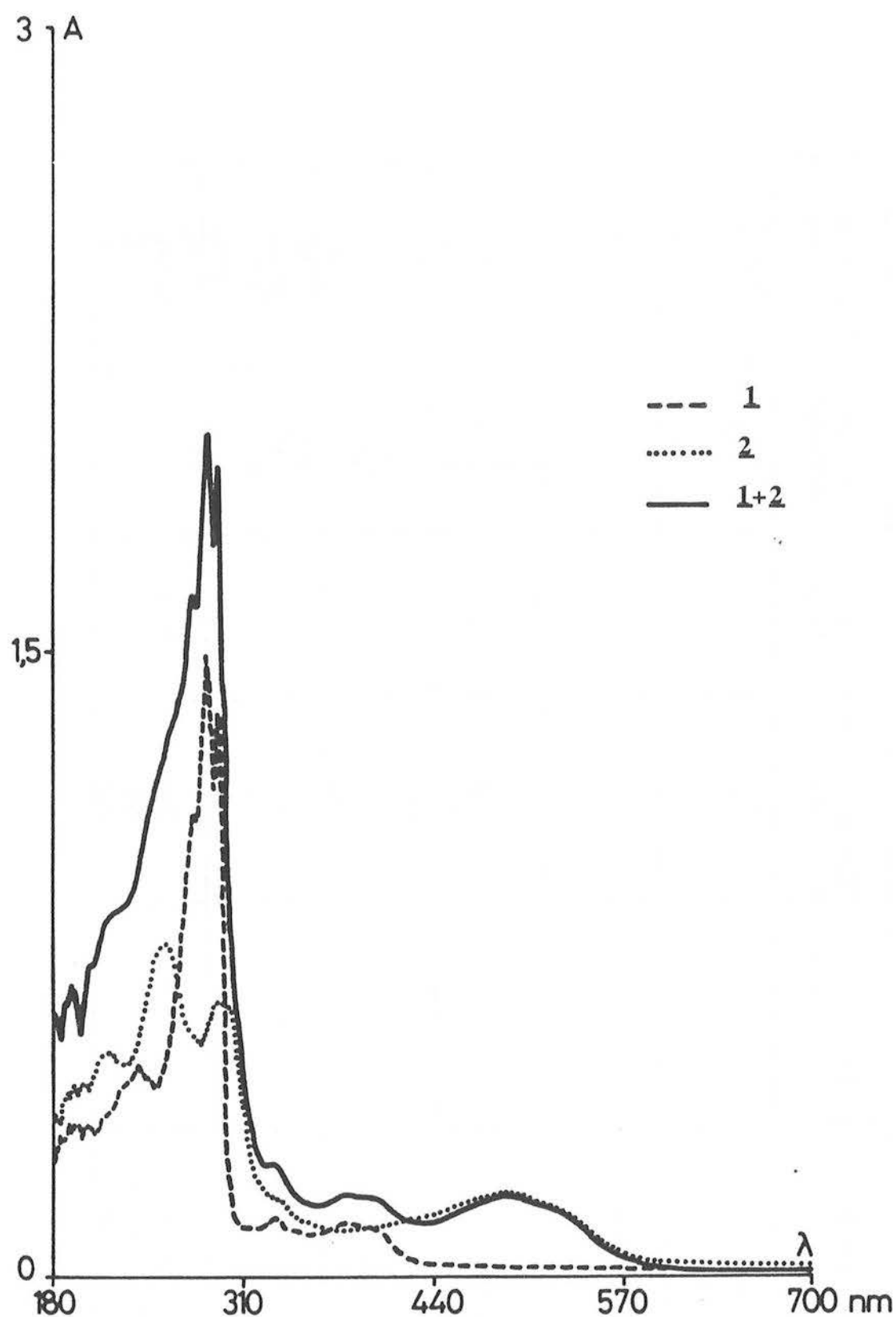


FIGURE III.7 : SPECTRE D'ABSORPTION DES SOLUTIONS OXYDEES.
(1 = ELLIPTICINE, 2 = 9-OH ELLIPTICINE EN SOLUTION DANS DU
METHANOL PUR A LA CONCENTRATION DE 5 µg.ml⁻¹).

Composé	Concentration (en $\mu\text{mole/l}$)	Longueur d'onde (nm)	Absorbance théorique	Absorbance expérimentale	Coeff. spécifique d'absorbance molaire
Ellipticine	20,3	285		1,65	81.600
		293		1,52	75.000
		331		1,14	7.000
		380		0,11	5.400
9-OH ellipticine	19,1	280		0,85	44.500
		291		1,03	54.000
		336		0,16	8.400
		403		0,09	4.600
Ellipticine + 9-OH ellipticine	19,7	285	2,5	2,62	133.000
		293	2,55	2,59	131.500
		334	1,3	0,29	14.700
		398	0,2	0,19	9.600
Ellipticine + oxydant	20,3	284		1,33	65.500
		293		1,2	59.100
		332		0,14	6.900
		380		0,15	7.400
9-OH ellipticine + oxydant	19,1	257		0,8	41.900
		292		0,66	34.600
		383		0,11	5.800
		490		0,2	10.500
Ellipticine + 9-OH ellipticine + oxydant	19,7	285	-	2,02	102.500
		293	1,86	1,95	99.000
		381	0,26	0,2	10.100
		490	0,2	0,2	10.100

TABLEAU III.2 : PARAMETRES DES SPECTRES ELECTRONIQUES.

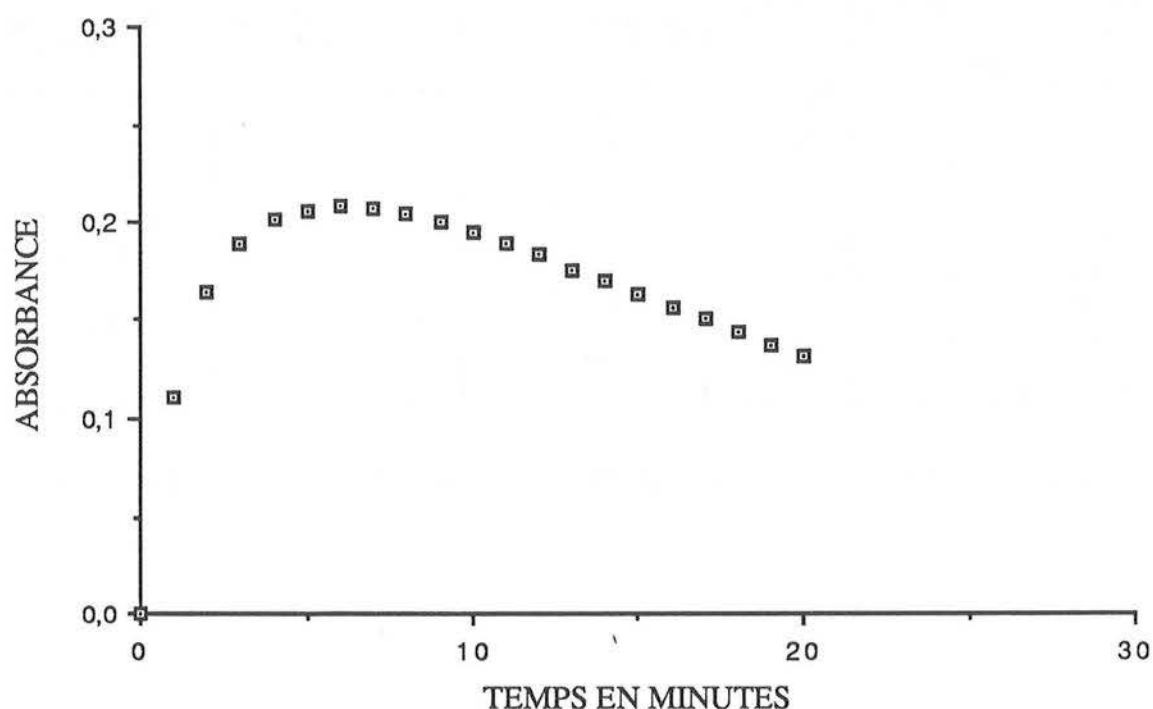


FIGURE III.8 : CINETIQUE DE LA REACTION COLOREE A 490 nm
(CONCENTRATION DE 9-OH ELLIPTICINE DE $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ EN SOLUTION DANS DU METHANOL PUR; VOLUME REACTIONNEL DE 2 ml EN PRESENCE D'HYPOCHLORITE DE SODIUM).

c) Vérification de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert à 490 nm est vérifiée si l'on fait varier les concentrations en 9-hydroxy ellipticine de 1 à $40.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Les résultats de la variation de la concentration en fonction de l'absorbance figurent dans le Tableau III.3. Dans cette gamme de concentrations, l'Ellipticine n'absorbe pas à la longueur d'onde considérée; il est toutefois intéressant de vérifier si ce produit n'interfère pas avec la coloration rose lorsqu'il est présent en grande quantité, ce qui se produira en début de synthèse du dérivé hydroxylé. La Figure III.9 présente les courbes reliant l'absorbance à la concentration en dérivé 9-hydroxylé si ce composé est pur ou mis en présence d'Ellipticine à différentes concentrations. L'examen de ces courbes montre que l'Ellipticine n'interfère pas sur les dosages colorimétriques du dérivé substitué pour des concentrations égales ou inférieures à $3.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Pour des concentrations supérieures, les valeurs théoriques obtenues en utilisant la loi de Beer-Lambert sont des valeurs par défaut. Pour une concentration de $4.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ l'estimation de l'erreur commise est de 30% environ.

Concentration (C) des composés (en micromoles/litre)	Absorbance expérimentale (log I/I ₀)		Equation de la droite de regression Absorbance = aC + b	
	Ellipticine	9-OH ellipticine	Ellipticine	9-OH ellipticine
1	0,011	0,021	a = 137,52 b = 0,0105 Coeff.cor.= 0,931	a = 7905,42 b = 0,0120 Coeff.cor.=0,997
2	0,012	0,029		
5	0,011	0,048		
10	0,011	0,106		
15	0,012	0,133		
20	0,013	0,181		
25	0,014	0,203		
30	0,014	0,238		
40	0,017	0,331		

TABLEAU III.3 : VERIFICATION DE LA LOI DE BEER-LAMBERT A 490 nm.

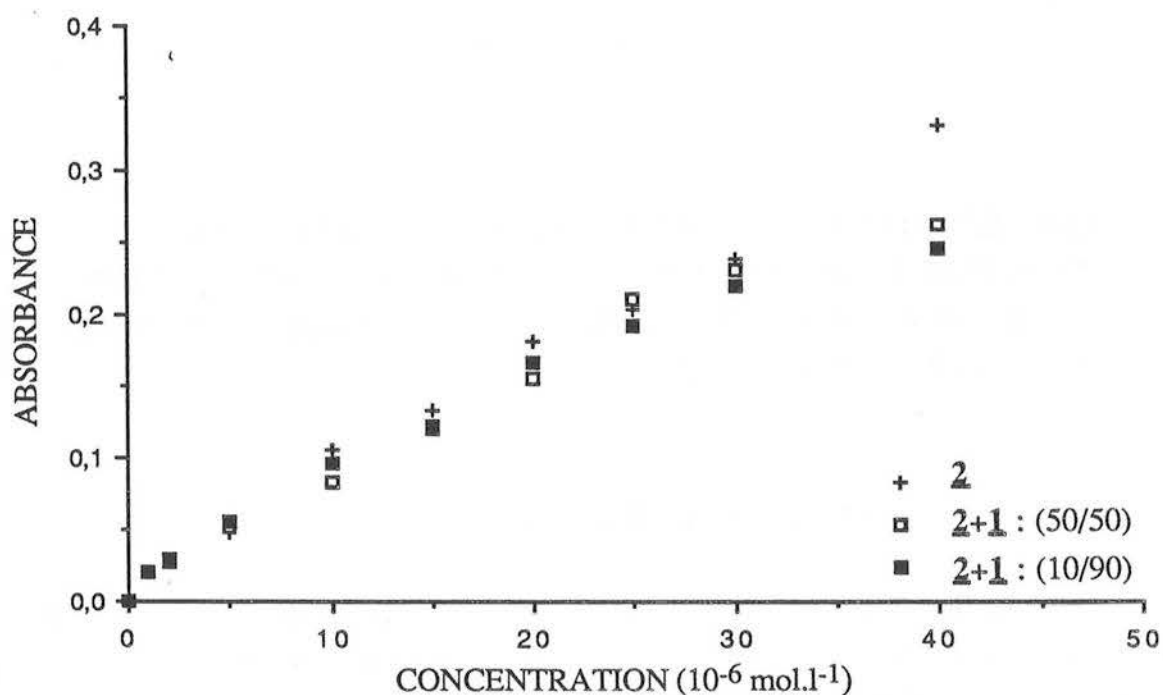


FIGURE III.9 : VARIATION DE L'ABSORBANCE DE LA 9-OH ELLIPTICINE (2) EN MILIEU OXYDANT (NACLO), EN PRESENCE (□, ■) ET EN ABSENCE (+) D'ELLIPTICINE (1) A 490 nm.

d) Concentration en hypochlorite de sodium

La quantité d'hypochlorite de sodium a une importance sur les résultats des dosages. En effet, un large excès d'hypochlorite de sodium favorise la décomposition du produit de réaction. Si

l'oxydant est trop concentré, en présence d'hydroxy-9 ellipticine, il se produit une coloration rouge fugace, si bien que le dosage devient tout à fait impossible. Pour tous les dosages, nous avons ajouté 10 µl d'une solution d'hypochlorite de sodium à $32,4.10^{-3}$ mol.l⁻¹ par millilitre de solution organique.

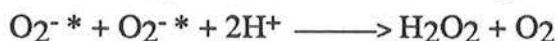
III.2.3.2 - Etude Chromatographique

Nous avons aussi essayé d'étudier les possibilités de dégradation de la 9-hydroxy ellipticine par chromatographie.

III.2.3.2.1 - Chromatographie sur couche mince

Nous avons constaté (cf III-1-2) que la 9-OH ellipticine se dégradait lorsqu'elle était mise en solution dans le méthanol ou d'autres solvants organiques.

Auclair [40] a explicité le mécanisme par voie radicalaire en milieu basique :



Néanmoins lorsque la 9-oxo ellipticine est laissée quelques heures en milieu alcoolique, une étude par chromatographie sur couche mince nous montre l'existence d'autres produits que ceux décrits ci-dessus.

Etant donné l'intérêt que nous portons à la 9-OH ellipticine qui se dégrade rapidement en 9-oxo ellipticine, il nous a paru intéressant d'étudier les produits de décomposition de la 9-oxo ellipticine.

Pour essayer d'expliquer ce phénomène, nous avons effectué une étude approfondie en chromatographie sur couche mince des dérivés de la 9-OH ellipticine.

Le Tableau III.4 présente tous les résultats obtenus pour les composés suivants: Ellipticine; 9-OH et 9-oxo ellipticine pures et dégradées; 9-OH et 9-oxo ellipticine oxydées.

On peut noter la très faible dégradation de la 9-OH ellipticine lorsqu'elle est mise en solution dans du méthanol dégazé à l'azote et lorsque l'on prend toutes les précautions nécessaires au cours de sa migration sur une plaque de C.C.M (présence d'azote). Le spot rouge ($R_f = 0,65$) apparaissant classiquement est extrêmement ténu. L'oxydation par l'oxygène de l'air semble donc importante. On constate que les spots apparus pour la 9-OH ellipticine dégradée correspondent aux quatre fractions obtenues lors de la synthèse des dérivés 9-OH et 9-oxo mono ou di-méthoxylés en position 10 sur l'Ellipticine.

Composés (méthanol)	Ellipticine	9-OH E	9-OH E dégradée	9-oxo E pure	9-oxo E dégradée	9-OH E oxydée	9-OH E suroxydée	9-oxo E + méthylate (Na)
Rf et couleur du spot	0,45 (J)	0,65 (R) 0,50 (J)	0,68 (V) 0,43 (O) 0,30 (ro) 0,21 (O)	0,65 (R)	0,65 (R) 0,50 (J) 0,43 (O)	0,65 (R)	0,72 (J) 0,68 (V) 0,43 (O)	0,68 (V) 0,46 (O) 0,30 (ro) 0,21 (O)

TABLEAU III.4 : Rf ET COULEUR DES SPOTS DES SUBSTANCES

ANALYSEES PAR C.C.M (avant révélation à l'iode).

(J = Jaune, O = Orange, R = Rouge, ro = Rose, V= Violet ; **En gras** : tache intense)

Il faut noter que les dérivés méthoxylés n'ont pu être obtenus purs, les produits analysés sont des mélanges riches en mono-méthoxy ou en di-méthoxy selon les solutions concernées.

III.2.3.2.2 - Chromatographie liquide

L'analyse par C.L.H.P. des produits obtenus montre l'apparition de nombreux pics. Le tableau III.5 mentionne les différents temps de rétention obtenus.

	TEMPS DE RETENTION								
9-OH E	2,9			3,3-3,5	3,7-4,1			5,3-5,5	
9-OXO E	2,9			3,4	3,7-4,0		5,0	5,4	
ELLIPTICINE							4,9-5,1		
9-oxo,10,10-diméthoxy E	2,8	3,05	3,2	3,4-3,7	4,1	4,5	4,9	5,4	6,4
9-oxo,10-méthoxy E	2,85	3,1		3,5	4,1		5,0	5,4	6,4

TABLEAU III.5: TEMPS DE RETENTION DES DIFFERENTS PRODUITS SYNTHETISES ET DES TEMOINS (293 nm).

(Les t_R notés en gras mentionnent des pics importants).

On constate que ces différentes substances sauf l'Ellipticine mais incluant la 9-OH ellipticine laissée plusieurs jours en solution dans le méthanol, se dégradent avec des t_R tout à fait comparables.

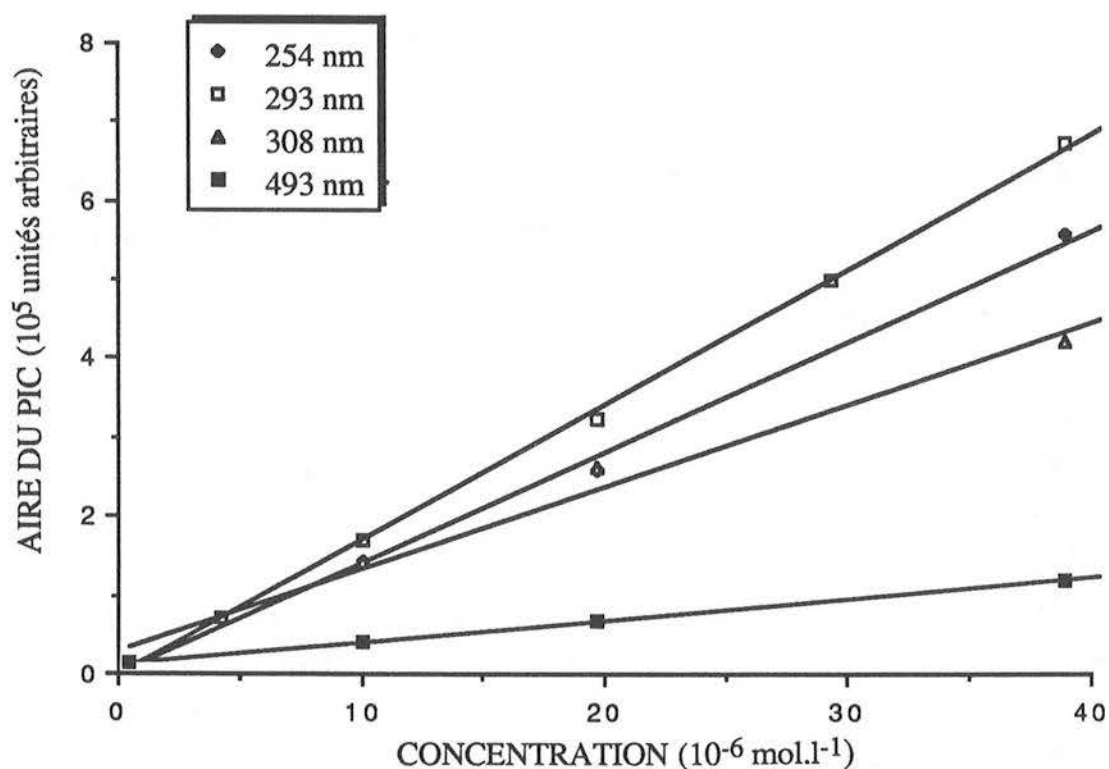


FIGURE III.10 : ABSORBANCE COMPAREE DE LA 9-OXO ELLIPTICINE.

La Figure III.10 mentionne l'absorbance comparée de la 9-oxo ellipticine en fonction des quatre longueurs d'onde déjà citées (254, 293, 308, 493 nm).

On remarque une nouvelle fois que cette quinone-imine absorbe à toutes les longueurs d'onde et plus particulièrement à 293 et 493 nm ce qui prouve la dégradation de cette 9-oxo ellipticine en plusieurs sous-produits déjà vérifiée par C.C.M.

On notera que la longueur d'onde de 493 nm est légèrement différente de celle utilisée pour l'étude colorimétrique (490 nm). On peut considérer cet écart menu, lié à l'appareil, comme négligeable.

Ces résultats nous permettent d'envisager la résolution des pics apparus lors de nos essais de bioconversion. En effet, on peut considérer que tous les pics qui apparaîtront aux t_R indiqués sur le tableau III.5 sont issus de la 9-OH ellipticine. Ceci est démontré par les t_R des formes méthoxylées de quinone-imine dont l'analyse spectrale a confirmé les structures. Ainsi sur la base de cette analyse, nous pourrions déterminer dans un premier temps le pic de 9-OH ellipticine formé par bioconversion puis comptabiliser ensemble tous les pics de dégradation qui sont issus de notre dérivé hydroxylé.

La bibliographie mentionne pour la forme 8-hydroxylée un temps de rétention supérieur à celui de l'Ellipticine pour des conditions opératoires identiques. De ce fait nous comptabiliserons séparément tous les pics éventuellement apparus après le pic de l'Ellipticine et pouvant correspondre à d'autres substances qu'à celles recherchées.

Pour plus de précautions, nous procéderons pour chaque analyse quotidienne à l'injection de ces témoins correspondant aux produits de dégradation de la 9-OH ellipticine.

III.2.3.3 Discussion

L'Ellipticine ne donne pas de coloration avec l'hypochlorite de sodium. Le site responsable de la réaction se trouve donc dans la partie indolyle de l'alkaloïde et non dans sa partie diméthylisoquinolyle. De plus, le réactif étant un oxydant, le mécanisme réactionnel doit être de nature oxydoréductrice.

Il est connu que l'oxydation des phénols conduit à la formation de quinones [151,152] et que les dérivés indoliques hydroxylés sur le cycle benzénique ont tendance à réagir facilement en présence d'oxydant [153]. La 9-hydroxy ellipticine, étant un dérivé fortement conjugué d'un hydroxyindole, se comporte de manière similaire et il est normal qu'elle réagisse avec un oxydant contrairement à l'Ellipticine qui ne possède pas de groupement hydroxylé sur le système hétérocyclique. Les indoles hydroxylés sont oxydés en milieu acide en orthodiquinone [154] selon un mécanisme irréversible en 2 étapes par l'intermédiaire d'une semi quinone-imine instable [154,155]. Ce mécanisme est également admis lors de l'oxydation de dérivé de l'indole comme par

exemple la sérotonine [156]. Il est vraisemblable que l'action antitumorale de l'hydroxy-9 ellipticine se fasse par le passage d'une para-imine quinone via un radical "phenoxylike"[11].

Nos réactions de coloration ont lieu en milieu basique ou neutre. Lorsque la solution d'hydroxyellipticine est acide, la coloration rose-orangée n'est pas visible. Il est normal que l'oxydation de la 9-OH ellipticine n'ait pas lieu en milieu acide puisque, d'après le mécanisme de Verbiesse [154], l'aromaticité du système hétérocyclique serait détruite lors de la première étape de la réaction. De plus, un milieu acide ne favorise pas la première étape du mécanisme (passage d'un phénol en phénate).

Le spectre infrarouge du dérivé coloré montre l'existence d'une bande d'absorption à 1635 cm^{-1} attribuable à la vibration d'un carbonyle conjugué, et d'une bande à 1625 cm^{-1} due aux liaisons aromatiques. Ce spectre est voisin, dans ce domaine de longueur d'onde, de celui de la cyclohexènone [151,157]. Pour conserver la conjugaison électronique sur l'ensemble du système hétérocyclique, il est indispensable que le système oxydé soit de nature semi quinone-imine. La longueur d'onde de photoabsorption du système iminocétone calculée à l'aide des règles de Woodward appliquées aux composés carbonylés α,β insaturés [158] est de 505 nm, valeur proche de la longueur d'onde expérimentale.

Il est connu que les quinones sont des oxydants doux d'autant plus actifs qu'ils sont plus conjugués. Dans notre cas, l'addition à la solution rose d'un réducteur tel que le fer II fait disparaître immédiatement la coloration, celle-ci réapparaissant après une nouvelle addition d'oxydant: la réaction d'oxydoréduction est donc réversible. Cette rétro réaction est en accord avec les résultats de Meunier et al.[150] qui réduisent une 9-oxo ellipticine, obtenue par synthèse, en 9-hydroxy ellipticine. Nous pouvons donc retenir dans un premier temps un mécanisme réactionnel comparable à celui décrit par Auclair [40] et Meunier [41] par l'intermédiaire d'une réaction rédox à 2 électrons, présenté sur la Figure III.11.

Nous avons utilisé un autre oxydant ainsi que le 5-hydroxyindole, partie active du dérivé de l'Ellipticine pour confirmer ces résultats. Le permanganate de potassium en milieu neutre conduit au même résultat : formation d'un composé coloré absorbant à 501 nm ($\epsilon = 14500$) avec une cinétique de quatre minutes. Les différences notées tant pour la longueur d'onde d'absorption maximale que pour le coefficient spécifique d'absorbance molaire proviennent probablement de la différence du milieu, la solvation de la quinone-imine étant modifiée. L'oxydation par les ions hypochlorites du 5-hydroxyindole conduit de même à une réaction colorée ($\lambda = 410\text{ nm}$, $\epsilon = 3750$, $t = 3\text{ minutes}$), le déplacement notable de la longueur d'onde provient du nombre inférieur d'électrons p dans la semi quinone-imine correspondante (λ calculée = 436 nm).

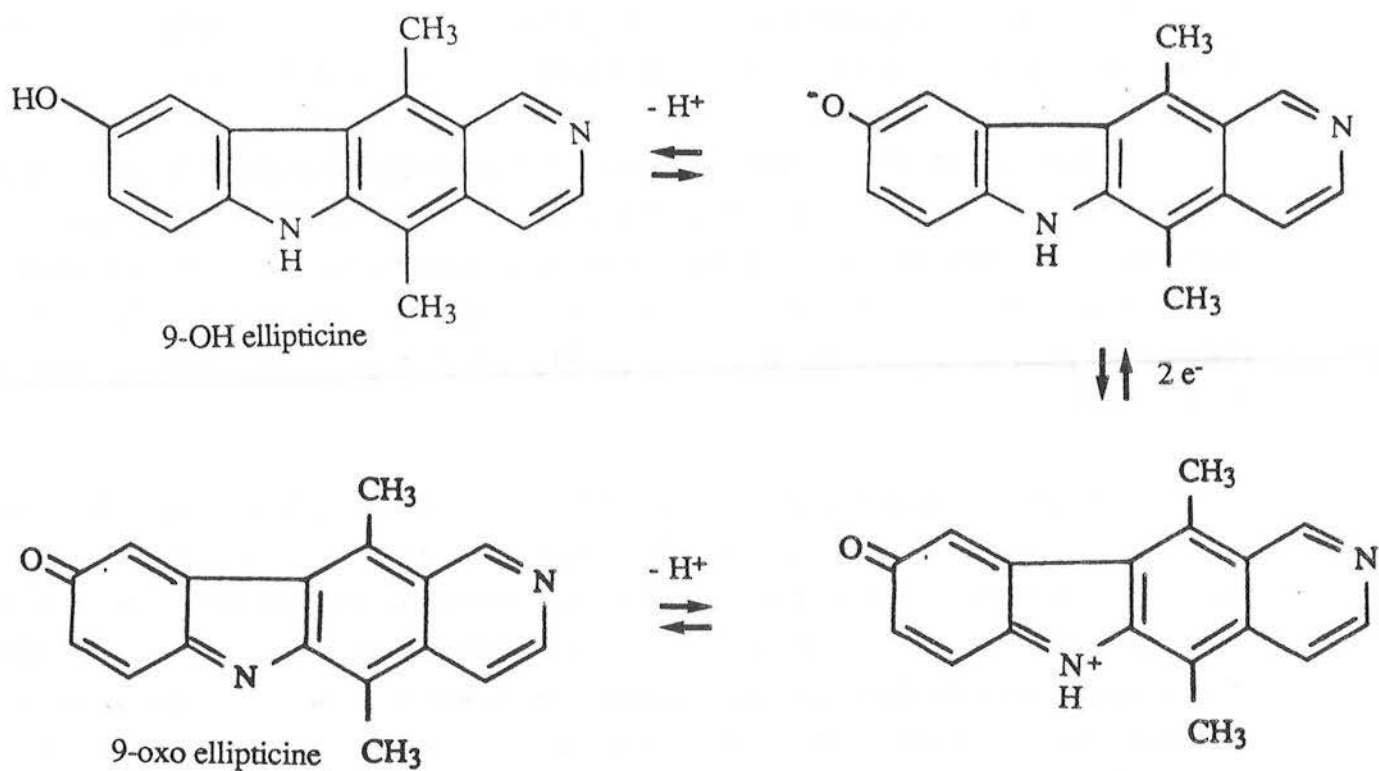


FIGURE III.11 : MECANISME REACTIONNEL DECRIT DANS LA LITTERATURE [40,41].

Composés (méthanol)	9-OH E	9-OH E dégradée	9-oxo E dégradée	9-OH E oxydée	COMPOSE IDENTIFIE
Rf et couleur du spot		0,68 (V)			9=O,10-OCH3 Ell.
	0,65 (R)		0,65 (R)	0,65 (R)	9=O ellipticine
	0,50 (J)		0,50 (J)		non identifié
		0,43 (O)	0,43 (O)		9=O,10,10-di-OCH3 Ell.
		0,30 (ro)			9-OH,10-OCH3 Ell.
	0,21 (O)	0,21 (O)	0,21 (O)	0,21 (O)	9-OH ellipticine

TABLEAU III.6 : COMPOSES IDENTIFIES ISSUS DES PHENOMENES DE DEGRADATION DE LA 9-OH ELLIPTICINE.

Il est connu que le site réactionnel en C₁₀ de l'Ellipticine hydroxylée est très réactif vis-à-vis des nucléophiles [41]. Cette particularité a été montrée aussi bien expérimentalement que théoriquement. Le solvant utilisé lors de cette étude étant nucléophile, il peut donc réagir avec la 9-oxo ellipticine, formée par oxydation de la 9-OH ellipticine. Ce phénomène pose un problème évident d'analyse.

Les analyses faites par chromatographie sur couche mince montrent que si la 9-oxo ellipticine pure mise en solution dans du méthanol immédiatement ne donne qu'un seul spot ($R_f = 0,65$) de couleur rouge, sa dégradation est assez rapide puisque l'on obtient très vite 4 spots : l'un correspond à la 9-OH ellipticine ($R_f = 0,21$), le deuxième à la quinone-imine ($R_f = 0,65$), plus 2 spots intermédiaires dont l'un présente une tache orangée assez intense ($R_f = 0,43$) attribuable à la 9-oxo,10 di-méthoxy ellipticine.

Il faut remarquer que la 9-OH ellipticine en présence d'azote ou en milieu acide ne se dégrade que très faiblement.

La 9-oxo ellipticine présente des spots de dégradation qui correspondent bien aux analyses effectuées lors de la synthèse de dérivés quinone-imines méthoxylés.

En effet, les spots obtenus pour la quinone-imine di-méthoxy présentent une tache orange intense de $R_f = 0,46$. En revanche, la quinone-imine mono-méthoxy présente un spot intense de couleur orangée de $R_f = 0,68$. Les produits n'étant pas purs, on retrouve dans chacun d'eux d'autres spots : pour la quinone imine di-méthoxy, un spot de quinone imine mono-méthoxy et réciproquement.

La 9-OH ellipticine oxydée par l'hypochlorite de sodium présente deux spots identiques mais d'intensité différente à ceux mentionnés pour la 9-OH ellipticine en solution dans du méthanol. La 9-hydroxy ellipticine suroxydée présente 4 spots :

- $R_f = 0,21$ correspondant à la 9-OH ellipticine (orange);
- $R_f = 0,43$ correspondant à la quinone-imine di-méthoxy (orange);
- $R_f = 0,68$ correspondant à la quinone imine mono-méthoxy (violet);
- $R_f = 0,72$ qui ne correspond pas à un produit connu (jaune).

Le Tableau III.6 résume les différents composés identifiés provenant de la dégradation de la 9-OH ellipticine.

Nous pouvons donc, sur la base de ces résultats, proposer le mécanisme réactionnel décrit sur la Figure III.12.

On peut maintenant expliquer la majorité des phénomènes expérimentaux.

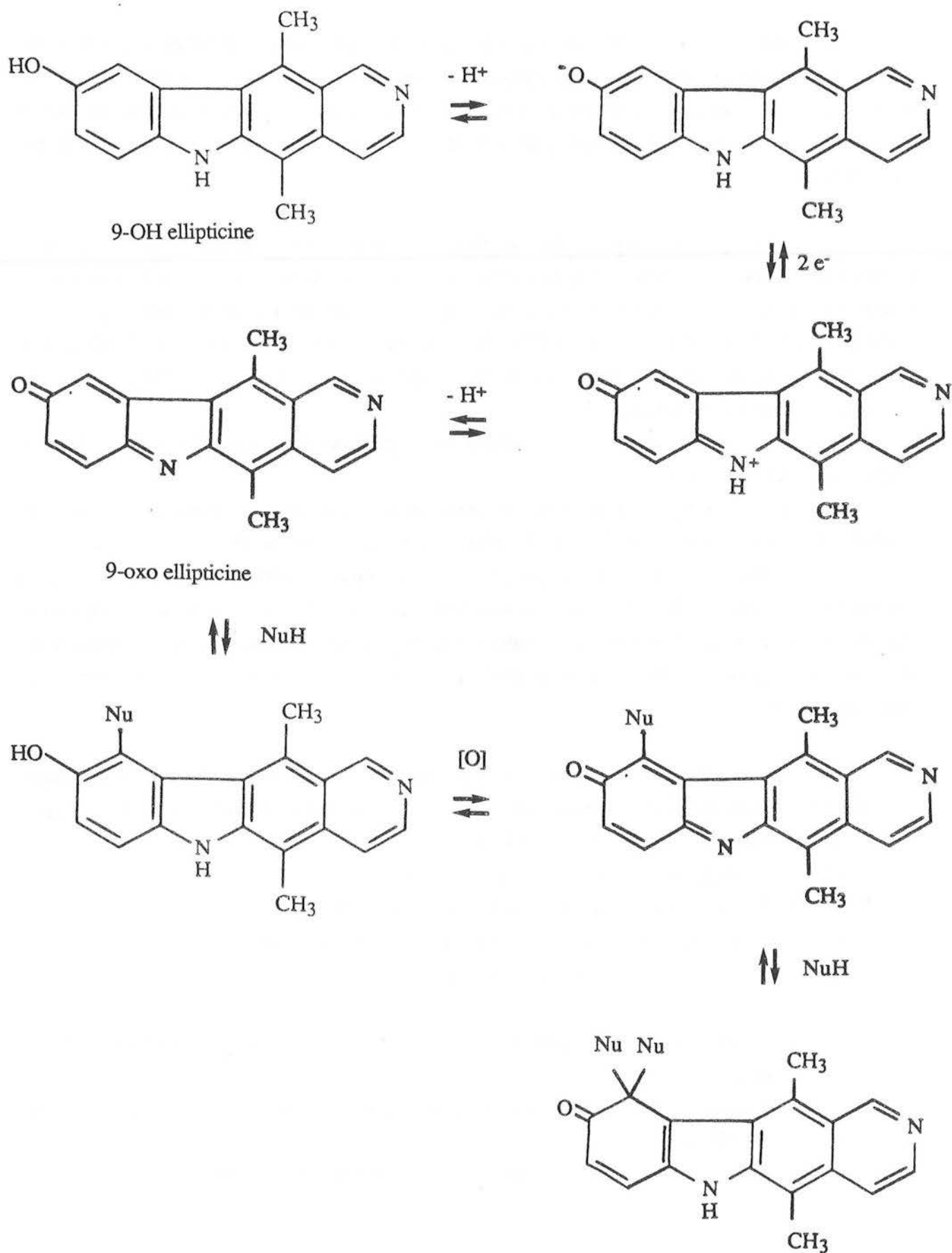


FIGURE III.12 : PROPOSITION D'UN SCHEMA REACTIONNEL DE
DEGRADATION DE LA 9-HYDROXY ELLIPTICINE.

Lorsque l'on met le dérivé 9-hydroxy ellipticine en solution dans un solvant organique, l'apparition d'une teinte rouge est explicable par formation de 9-oxo ellipticine, produit rouge absorbant à 488 nm (oxydation par l'oxygène de l'air).

Lorsque le solvant est nucléophile, il est possible d'avoir des produits secondaires résultant d'une addition de type Michaël (un nucléophile NuH agit sur une double liaison en α d'une cétone). Le nucléophile se place sur la position C₁₀ du système aromatique conformément aux calculs théoriques de Meunier et al.[41] (cf figure I.5).

Ces réactions sont beaucoup plus rapides si l'on met en présence la 9-OH ellipticine et un oxydant différent de l'oxygène. De plus, si nous plaçons un excès d'oxydant tel que l'hypochlorite de sodium, nous pouvons remarquer une teinte rouge fugace qui montre le passage par une 9-oxo ellipticine intermédiaire se dégradant en divers produits d'addition et un produit inconnu que nous n'avons pu déterminer.

Il est possible que ce produit non déterminé soit une diquinone 9-10 puisqu'il a été montré dans la littérature que l'oxydation du phénol conduit à une diquinone [151]. Mais, sa couleur devrait logiquement être rouge, ce qui n'est pas le cas. Il a été noté la production de dimères et/ou de polymères ainsi que de produits dismutés suggérés par Meunier et al.[41]. Nous ne pensons pas que ce produit inconnu soit un dimère ou un polymère puisque son R_f est élevé (le R_f d'un dimère ou d'un polymère serait attendu à une valeur plus faible).

La Figure III.13 matérialise ce phénomène où l'on peut voir la décomposition rapide dans le domaine du rouge (10 minutes environ) de la 9-oxo ellipticine en milieu oxydant.

Tous les phénomènes d'addition ou de dégradation se produisent d'après notre schéma de mécanisme réactionnel à partir de la 9-oxo ellipticine qui provient elle-même de la 9-OH ellipticine. L'instabilité de cette dernière est ennuyeuse lors de la synthèse industrielle de ce composé à partir de l'Ellipticine qui nécessite l'emploi de nombreux solvants organiques ou aqueux. Si nous désirons obtenir un rendement maximum en 9-OH ellipticine au cours d'une synthèse, il est donc impératif d'empêcher le passage :



Pour ce faire, la réaction étant de nature redox, il doit être possible d'utiliser un réducteur pour empêcher l'oxydation de la 9-hydroxy ellipticine et permettre ainsi sa stabilisation en milieu organique.

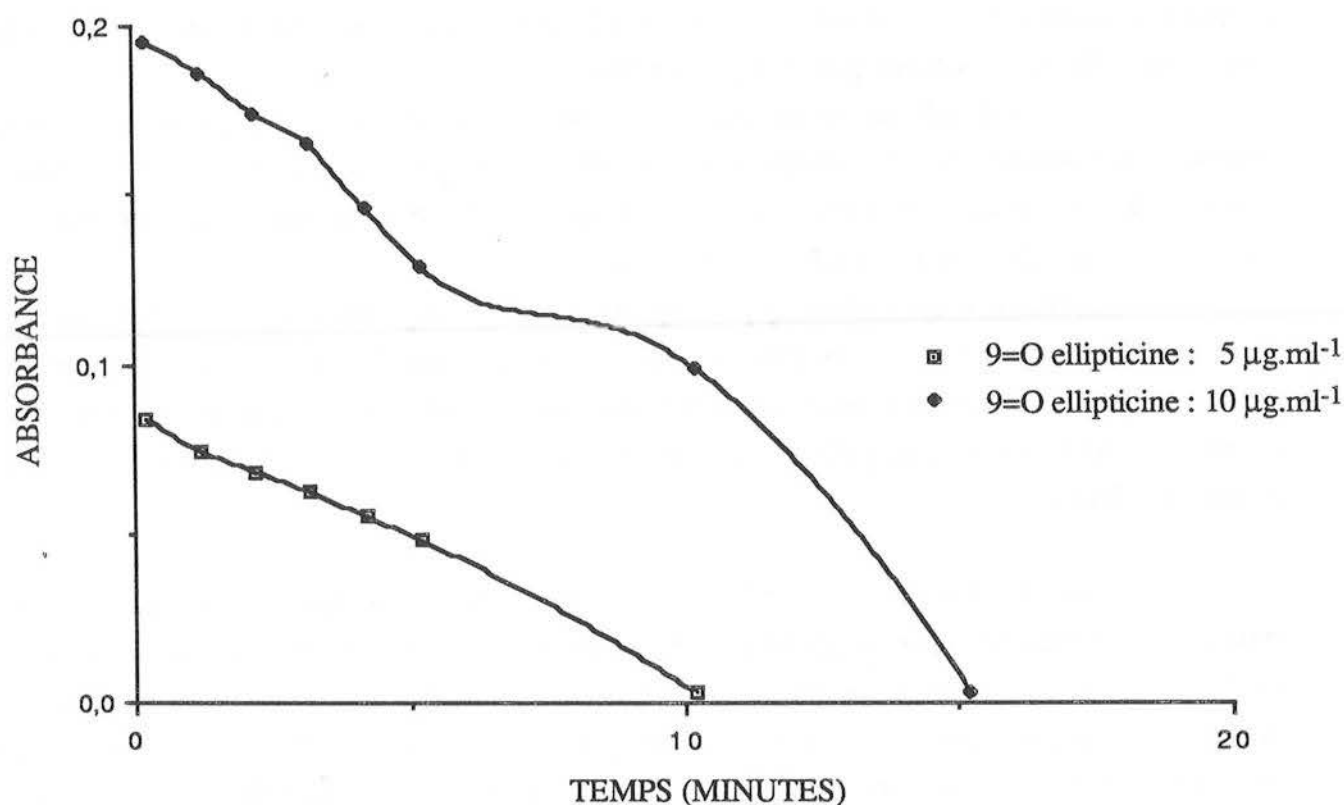


FIGURE III.13 : CINETIQUE D'ABSORPTION DE LA 9-OXO ELLIPTICINE
A 493 nm EN MILIEU OXYDANT.

III.2.4 - ESSAI DE STABILISATION DES DÉRIVÉS OXYDÉS

III.2.4.1 - Choix d'un réducteur

Pour empêcher ou tout au moins atténuer l'oxydation de la 9-OH ellipticine, il y a plusieurs choix possibles :

- * effectuer toutes les manipulations sous azote pour limiter l'oxydation du dérivé 9-hydroxylé mais cela est difficile à réaliser;
- * manipuler en milieu acide mais cela est impossible à obtenir tout au long de notre procédé;
- * utiliser un réducteur qui stabilise notre composé.

Ainsi, en nous appuyant sur la littérature, nous avons sélectionné plusieurs réducteurs ou stabilisants. Au préalable, nous les avons testés *in vitro* sur la 9-OH oxydée par NaClO, en milieu aqueux (notre milieu de bioconversion), puis en milieu méthanol (milieu d'analyse).

Nous avons retenu les réducteurs les plus efficaces : sulfate ferreux (FeSO₄), dithionite de sodium (Na₂S₂O₄), borohydrure de sodium (NaBH₄), acide ascorbique (C₆H₈O₆). Un complexant, l'acide d'éthylène diamine tétra acétique (E.D.T.A), a également donné de bons

résultats. Ces essais nous ont permis de déterminer également les quantités nécessaires de ces réactifs de façon à obtenir une réduction complète (retour à la 9-OH ellipticine contrôlée par spectrophotométrie en Ultra-violets). Le tableau III.7 présente le nombre de moles expérimentales de réactif nécessaire à la réduction d'une mole de 9-OH ellipticine oxydée par NaClO selon le réducteur utilisé.

REDUCTEUR	NOMBRE DE MOLES EXPERIMENTALES NECESSAIRE A LA REDUCTION	
	MILIEU METHANOL	MILIEU AQUEUX
C ₆ H ₈ O ₆	1	6
NaBH ₄	3	4
Na ₂ S ₂ O ₄	8	1
FeSO ₄	5	8
E.D.T.A	20	non mesurable

**TABLEAU III.7 : REDUCTION D'UNE MOLE DE 9-OH ELLIPTICINE OXYDEE
PAR LE NaClO SELON LE REDUCTEUR UTILISE.**

Nous avons aussi étudié le pouvoir "stabilisant" de ces réactifs, c'est-à-dire le nombre de moles de réactif nécessaire à l'inhibition de l'oxydation de la 9-OH ellipticine par le NaClO.

A l'issue de tous ces essais, l'acide ascorbique apparaît le plus efficace tant au niveau de la réduction d'une quinone-imine qu'au niveau de la stabilisation de la 9-OH ellipticine en milieu oxydant. De plus, ce composé est assimilable par l'organisme, naturel, peu coûteux et présente une forme ène-diol proche de la structure de la 9-OH ellipticine qui captera l'oxydation du milieu sur lui-même. Toutes ces raisons ont motivé le choix de l'acide ascorbique comme réducteur.

III.2.4.2 - Etude colorimétrique

Dans une solution alcoolique contenant notre dérivé 9-substitué, nous avons procédé à son oxydation avec une solution diluée d'hypochlorite de sodium selon les conditions opératoires déjà décrites précédemment (addition de 40 µl d'une solution aqueuse d'acide ascorbique à $2,84 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹). La quantité nécessaire à la réduction a été déterminée expérimentalement. La décoloration de la teinte rouge-brique de notre solution est alors immédiate. Au bout de 30 minutes, les mesures effectuées ne montrent aucune évolution.

La Figure III.14 donne les absorbances à $\lambda = 490$ nm, longueur d'onde maximale déjà déterminée.

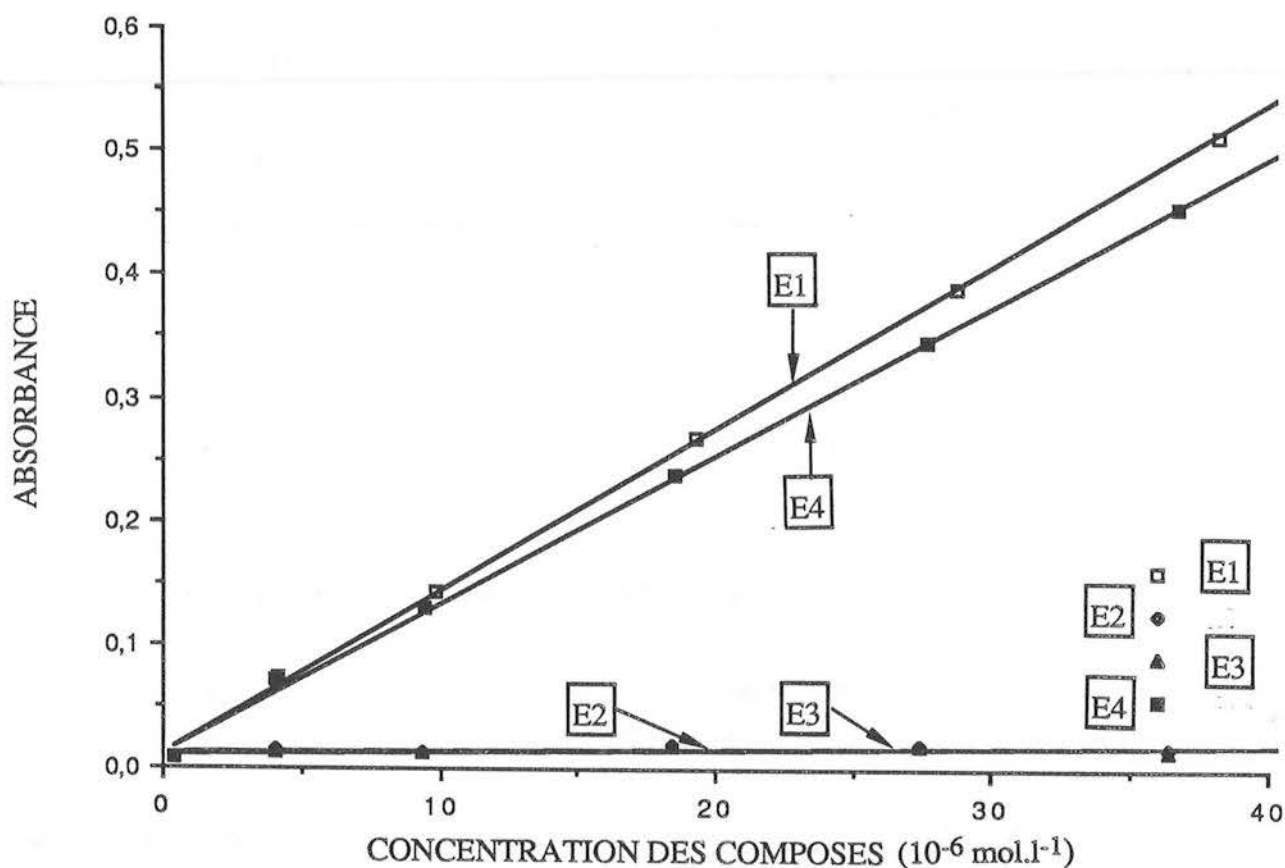


FIGURE III.14 : OXYDATION (E1) ET REDUCTION (E2) PUIS STABILISATION (E3) ET SUROXYDATION (E4) DE LA 9-OH ELLIPTICINE PAR LA VITAMINE C A 490 nm.
 (E1 = 9-OH ellipticine oxydée par du NaClO);
 (E2 = Réduction par l'acide ascorbique de la 9-OH ellipticine);
 (E3 = 9-OH ellipticine + Vitamine C oxydées par le NaClO en quantité identique à E1);
 (E4 = 9-OH ellipticine + Vitamine C oxydées par un excès de NaClO).

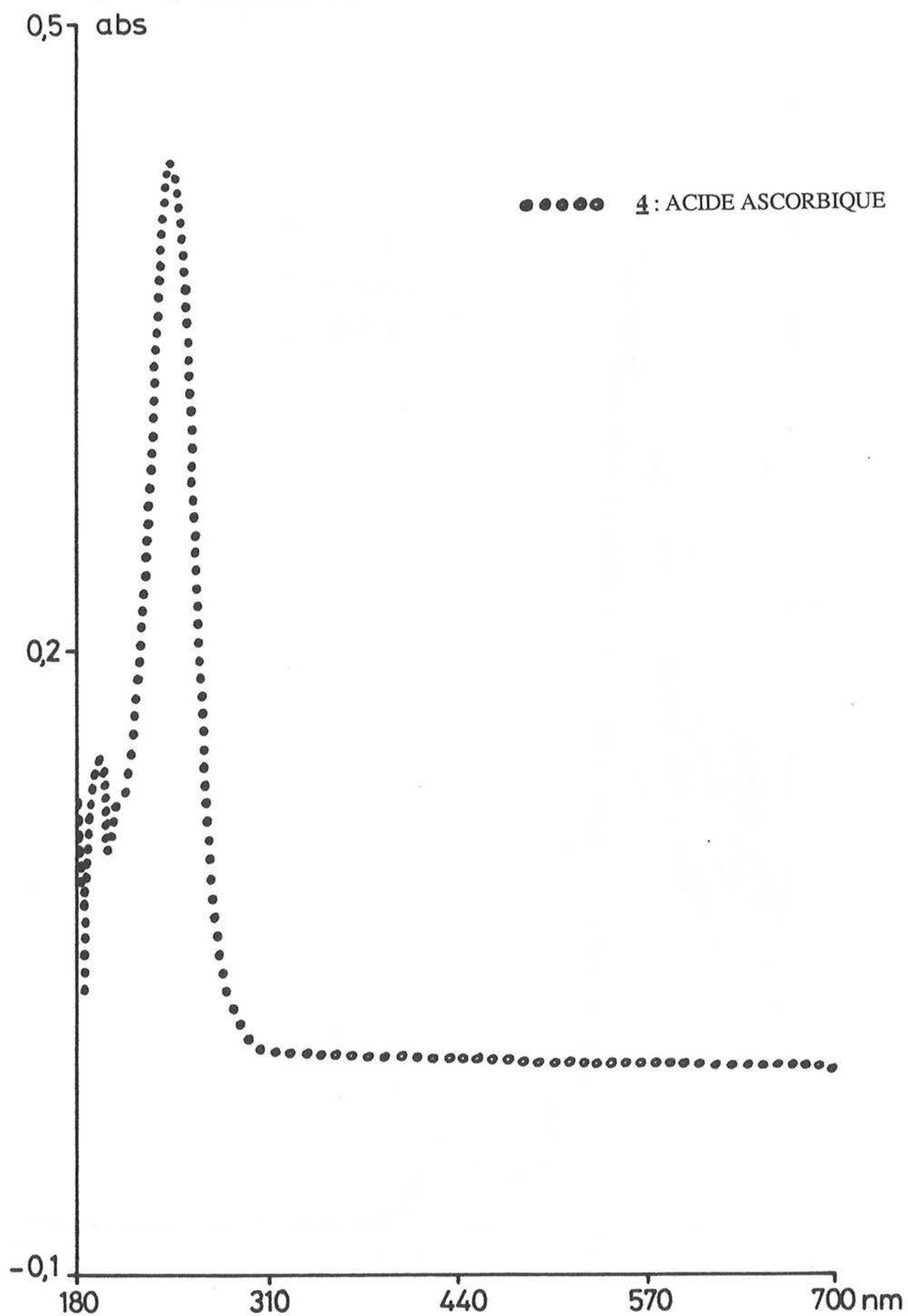


FIGURE III.15 : SPECTRE ELECTRONIQUE DE L'ACIDE ASCORBIQUE EN SOLUTION DANS LE METHANOL.

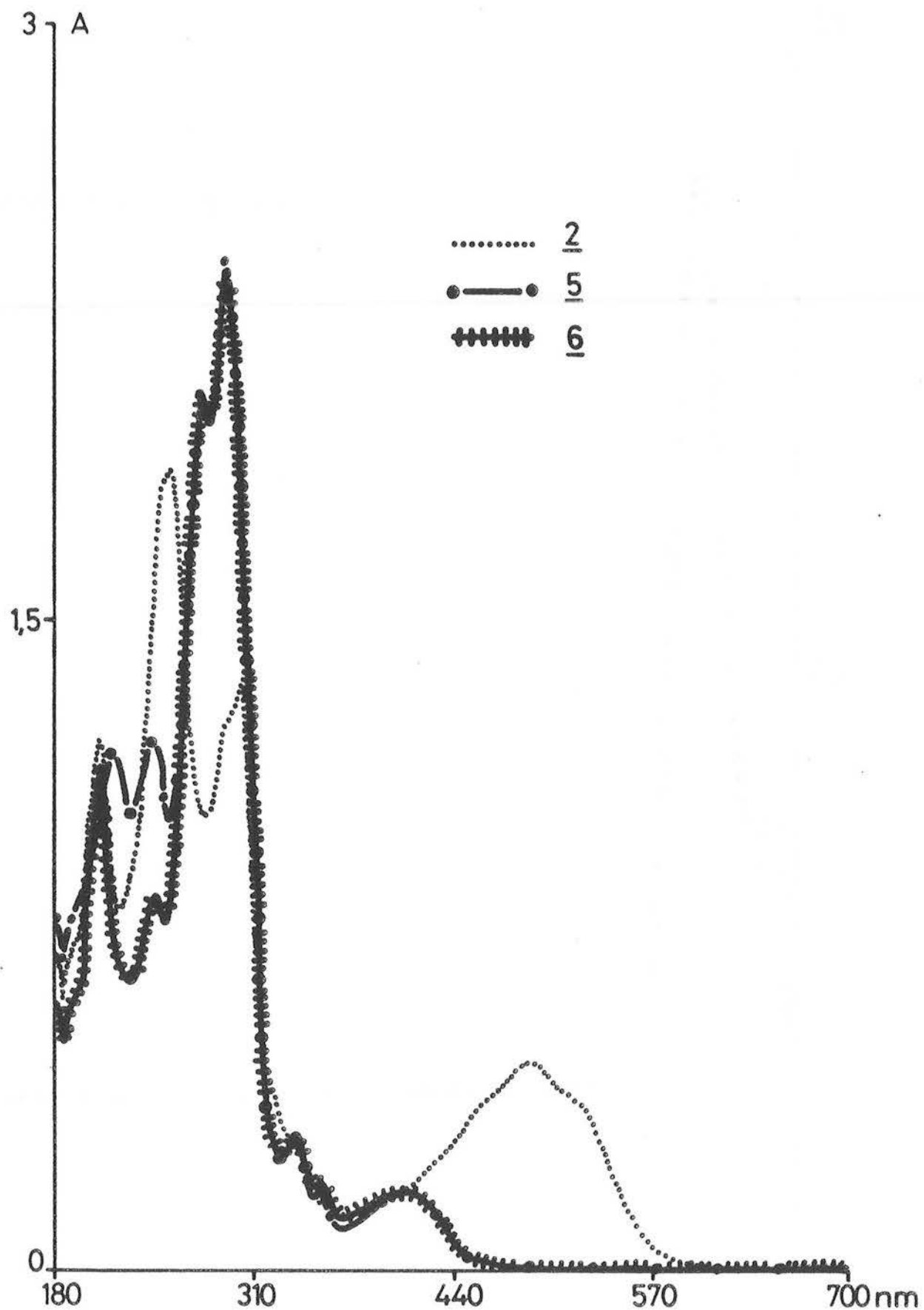


FIGURE III.16: SPECTRES ELECTRONIQUES DES SOLUTIONS D'HYDROXY-9 ELLIPTICINE REDUITES PAR L'ACIDE ASCORBIQUE.
(2 = 9-OH ELLIPTICINE OXYDEE; 5 = 9-OH ELLIPTICINE; 6 = 9-OH ELLIPTICINE + ACIDE ASCORBIQUE OXYDEE).

La droite E2 montre la réduction efficace par la vitamine C de la 9-OH ellipticine, oxydée auparavant et reprécisée sur la courbe E1. 5 essais ont été effectués. L'absorbance de la courbe E2 est toujours inférieure à 0,01. Par ailleurs, le spectre de l'acide ascorbique, à la même concentration et dans le même milieu, ne montre aucune absorbance à cette longueur d'onde et est présenté sur la Figure III.15.

Le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique est donc très appréciable et protège correctement d'une oxydation notre composé 9-hydroxylé en solution dans les solvants organiques. Néanmoins, l'addition à ces essais d'un excès d'hypochlorite de sodium fait réapparaître la couleur rouge-brique caractéristique de l'oxydation de la 9-OH ellipticine.

Nous avons ensuite procédé à la stabilisation d'une gamme d'étalonnage de la 9-OH ellipticine de concentrations identiques à celles de la courbe E1, puis à un essai d'oxydation de cette gamme avec la même quantité d'hypochlorite de sodium qui permet l'oxydation de E1. 40 μ l de la même solution aqueuse d'acide ascorbique ont été introduits avec la 9-OH ellipticine dans une solution alcoolique et l'ensemble est oxydé. La Figure III.14 mentionne la courbe E3, révélatrice de l'inhibition de l'oxydation de la 9-OH ellipticine. Cependant un excès d'oxydant permet la réoxydation de notre dérivé 9-hydroxylé figurée par la droite E4. Cette droite n'est pas exactement identique à E1. La perte enregistrée entre E1 et E4 est sans doute due à la succession de deux réactions d'oxydo-réduction. Cette perte est d'environ 8%, ce qui est relativement peu important. On peut donc admettre le pouvoir stabilisant de la vitamine C.

La Figure III.16 montre les spectres électroniques de la 9-OH ellipticine oxydée par une solution d'hypochlorite de sodium puis réduite par l'acide ascorbique. On observe que le spectre de la 9-OH ellipticine oxydée puis réduite est identique à celui correspondant à la 9-OH ellipticine pure. On a donc bien une réduction complète de la 9-oxo ellipticine dont le spectre est reprécisé.

III.2.4.3 - Essais sur des bioconversions

La vitamine C semblerait le réducteur le plus efficace *in vitro*. Nous avons voulu confirmer cette observation sur des essais *in vivo*. Dans ce but, nous avons testé les réducteurs déjà expérimentés sur nos bioconversions à différents stades du procédé de transformation.

Les analyses effectuées en chromatographie sur couche mince ne montrent pas de migration de la vitamine C déposée sur la plaque. Si on analyse un échantillon contenant de la vitamine C en fortes concentrations et résultant d'une biotransformation de l'Ellipticine, on note des différences dans les R_f des spots apparus :

- disparition du spot de couleur jaune-brune qui apparaît à un R_f de 0,72;
- réapparition du spot dont le R_f est de 0,68;

- le spot, dont le R_f est de 0,65, a une intensité plus forte;
- on observe également deux spots situés entre l'Ellipticine résiduelle ($R_f = 0,45$) et le spot précédent.

La vitamine C paraît moins efficace sur nos essais de bioconversions que dans les expériences menées *in vitro*.

Si on analyse le même échantillon par chromatographie en phase liquide, on ne constate pas l'élimination des nombreux pics qui apparaissent sur les chromatogrammes et correspondent aux formes oxydées de la 9-OH ellipticine. En revanche, le pic caractéristique de la 9-OH ellipticine pure ($t_R = 2,9$) est exalté et correspond à une quantité de 9-OH ellipticine plus importante. L'effet de la vitamine C est à ce niveau évident. La Figure III.17 expose le chromatogramme obtenu pour cet échantillon où l'on remarque la disparition relative des pics intermédiaires.

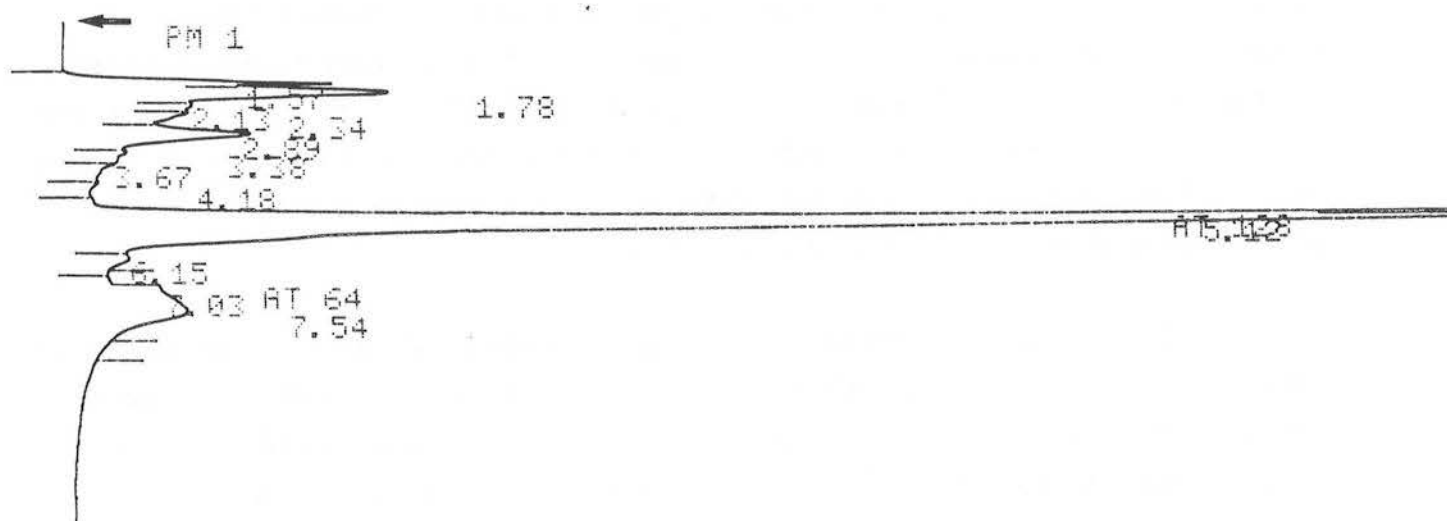


FIGURE III.17 : CHROMATOGRAMME OBTENU APRES STABILISATION DE LA 9-OH ELLIPTICINE PAR LA VITAMINE C AU COURS D'UNE BIOCONVERSION.

On peut donc constater que l'effet stabilisateur de la vitamine C est moins probant que dans les conditions opératoires définies *in vitro*. Il est vrai que les conditions opératoires rencontrées lors de la transformation de l'Ellipticine par le système fongique sont complexes et les possibilités d'interactions entre composés ainsi que l'oxydation du dérivé 9-OH ellipticine sont multiples.

CHAPITRE IV

RESULTATS ET COMPARAISONS

RESUME

FOOTNOTES AND REFERENCES

IV - RESULTATS ET COMPARAISONS

Après avoir étudié les moyens de dosage de la 9-OH ellipticine et de ses dérivés, nous pouvons aborder maintenant l'étude des différentes étapes nécessaires à la transformation de l'Ellipticine.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons à l'optimisation de la croissance de nos souches fongiques choisies. Nous avons défini un milieu de culture permettant une bonne croissance de la biomasse mycélienne (cf. chapitre II.3.3.2.1) en erlenmeyers. Quels sont les rendements obtenus ? Puis, lors de nos expérimentations en fermenteur, où le contrôle des paramètres est plus facile, nous définirons les rendements ainsi que les corrélations des différents paramètres intervenant dans une croissance.

Ensuite, nous analyserons nos résultats et nos observations sur le broyage et l'extraction de nos souches fongiques.

Quel est le moyen de broyage qui semble optimal ? La méthodologie d'extraction préconisée par la littérature apparaît-elle comme la meilleure possible ? Par rapport au calcul d'un rendement d'extraction théorique, où peut-on se situer ? Est-ce que le milieu complexe constitué de milieu de culture et de mycélium ne constitue pas un obstacle trop important à l'extraction aisée de substances hydrophobes converties de façon endocellulaire et, par conséquent, difficiles à extraire ?

Puis, nous nous pencherons sur les résultats de transformation. Y a-t-il une souche plus performante ? Quelle méthodologie permet un gain de productivité et de production appréciable ? Le fermenteur permet-il d'apporter une contribution effective à notre système de conversion ? Les choix faits au début de ce travail ont-ils démontré leurs bien-fondés ? Peut-on considérer qu'un système de transformation fongique de l'Ellipticine en 9-OH ellipticine est envisageable pour remplacer la synthèse chimique ?

Quelles conclusions peut-on tirer de l'utilisation du vivant à des fins industrielles dans la transformation de substances facilement oxydables ?

Enfin, nous examinerons les résultats d'essais d'oxydation biomimétique de l'Ellipticine. La voie chimique est-elle capable de reproduire ce que fait un système vivant ?

L'agencement de ces résultats, même s'il n'est pas chronologique, permettra de comprendre les différentes étapes unitaires logiques conduisant à la réalisation de notre objectif. Ce n'est que par l'étude isolée de chaque système que nous sommes arrivés à mieux cerner la problématique de ce sujet nécessitant l'interaction de plusieurs domaines scientifiques.

IV.1 - ETUDE DE LA CROISSANCE FONGIQUE

Le mode de croissance du mycélium confère aux milieux de fermentation des propriétés physiques différentes de ceux contenant des bactéries ou des levures. Chacune des catégories de mycélium présentant des formes filamenteuses ou en pelotes a ses propres caractéristiques concernant la cinétique de croissance, la consommation d'oxygène et la rhéologie.

Les souches utilisées doivent permettre d'obtenir un rendement maximal de transformation. Cependant, nous pouvons postuler que la formation du système enzymatique nécessaire à la conversion de l'Ellipticine sera d'autant plus élevée que la biomasse mycélienne sera importante. Ainsi, non seulement il est important de fournir le milieu de culture le plus adapté de façon à obtenir la meilleure croissance possible, mais il doit rester le moins coûteux possible.

Lors d'une culture ou d'une fermentation, de nombreux paramètres influent sur la productivité. L'étude et le contrôle de ces variables comme la température, le pH, la formation de mousse, la concentration en biomasse et en produits, l'aération et l'agitation permettent d'améliorer les rendements. Dans notre étude, nous nous intéresserons d'abord aux cultures réalisées en erlenmeyers puis nous aborderons le stade du fermenteur.

IV.1.1 - CULTURES EN ERLENMEYERS

Nous avons travaillé uniquement sur la souche *Aspergillus alliaceus*. En effet, de façon à obtenir une étude statistique fiable, nous avons voulu recueillir le maximum de données sur cette souche. Puis, au cours de quelques mesures, nous avons regardé s'il y avait une différence importante entre la souche étudiée et la souche *Cunninghamella echinulata*.

Nous avons réalisé plusieurs centaines de cultures en erlenmeyers avec la souche *Aspergillus alliaceus* de façon à déterminer statistiquement une courbe de croissance de cette souche pour notre milieu et dans les conditions définies au deuxième chapitre.

Ainsi, lors de chaque étude de transformation, nous prélevons aléatoirement 15 % des erlenmeyers pour établir, d'une part un poids sec étalon pour nos conversions et, d'autre part, une courbe de croissance.

IV.1.1.1 - Courbe de croissance de la souche *Aspergillus alliaceus*

La figure IV.1 montre la courbe obtenue, proche d'une courbe de croissance type. Chaque point quotidien mesure une valeur de biomasse et représente la moyenne non biaisée de 12 valeurs, chacune de ces 12 valeurs étant elle-même une moyenne de 6 à 10 erlenmeyers en culture.

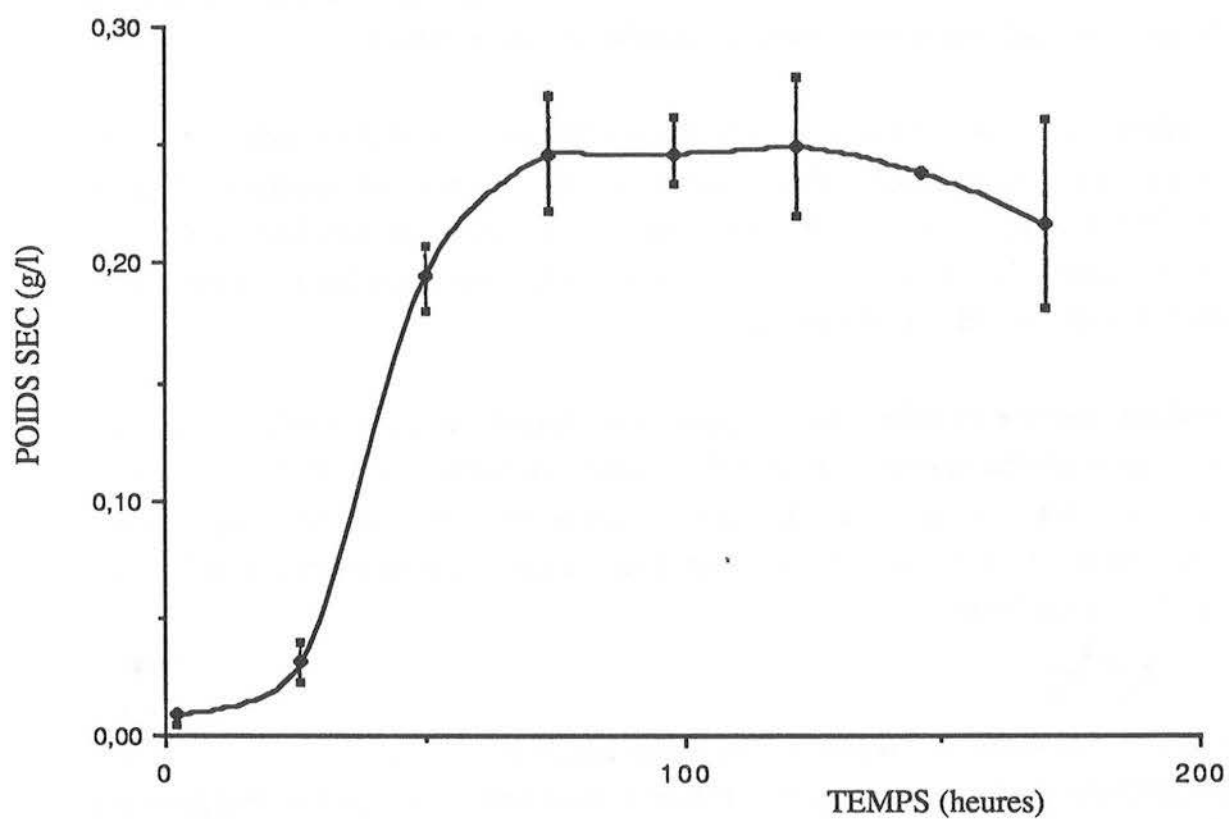


FIGURE IV.1 : COURBE DE CROISSANCE MOYENNE OBTENUE EN ERLLENMEYERS.

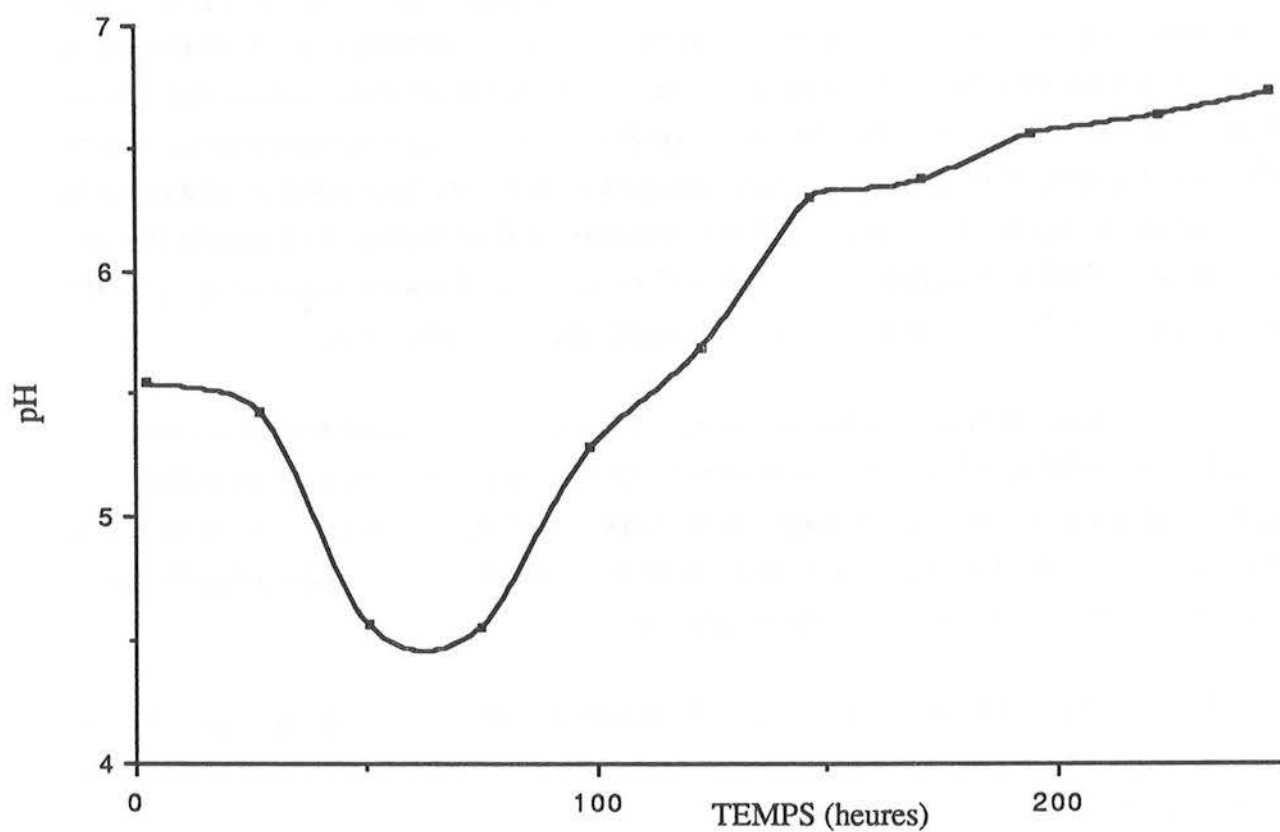


FIGURE IV.2 : VALEURS DU pH DES CULTURES EFFECTUEES EN ERLLENMEYERS.
(Les conditions de culture sont rappelées en Annexe I).

Nous avons pris volontairement le poids sec au niveau d'un erlenmeyer entier car il est strictement impossible d'avoir, d'une quelconque autre manière, un poids sec représentatif.

L'inoculum a toujours été fait dans les mêmes conditions : à partir d'une culture de phase I, nous avons broyé la culture de façon à obtenir, autant que faire se peut, une suspension la plus liquide possible. 250 μ l étaient alors injectés dans un nouveau milieu de culture. Pour déterminer l'inoculum moyen introduit dans les erlenmeyers de phase II, nous avons procédé à l'estimation de la moyenne sur 50 inoculums : $\bar{m} = 0,44.10^{-2}$ mg.

En ce qui concerne les valeurs moyennées de notre courbe, nous avons défini, à partir de cette moyenne \bar{m} , un intervalle de confiance destiné à fournir une estimation de la déviation d'une valeur approchée par rapport à la valeur vraie. De façon à avoir un estimateur non biaisé qui n'est pas exhaustif et en considérant une loi normale, nous avons adopté une pondération $n-1$ selon l'échantillonnage et le calcul donne:

$$x = \bar{m} \pm \frac{2\sigma}{\sqrt{n-1}}$$

x définit ainsi les limites inférieures et supérieures de l'intervalle de confiance.

Les limites de confiance calculées pour chaque point (sauf la valeur 144 heures) prouvent que la variabilité de notre souche est très faible jusqu'à la phase stationnaire.

En fin de phase exponentielle de croissance, on peut expliquer facilement la plus grande variabilité d'une souche car le milieu appauvri ne permet plus un entretien du champignon qui s'autolyse. Ce phénomène de mort partielle est un phénomène discontinu suivant une loi de probabilité. Il est donc logique de constater une variabilité inhérente aux systèmes vivants. D'autre part, il faut noter la difficulté croissante des mesures après 4 ou 5 jours de croissance car à partir de la phase stationnaire, le colmatage des filtres devient de plus en plus fréquent et ne permet plus une filtration complète. Seul le chauffage au four à 105°C peut éliminer l'eau résiduelle ce qui perturbe quelque peu la justesse des mesures et augmente la variabilité des mesures faites.

Si l'on calcule le taux de croissance maximum μ_{\max} de cette souche selon la courbe, on constate que $\mu_{\max} = 0,167 \text{ h}^{-1}$. L'optimum de croissance se situe à 72 heures, pour un poids sec de 241 mg. Ces valeurs se situent dans la moyenne pour une culture en erlenmeyer où l'on ne régule vraiment que la température et l'agitation comme paramètres. Etant donné qu'il n'y a pas d'aération dans nos erlenmeyers, nous ne pouvons calculer un $K_L a$.

La Figure IV.2 présente la courbe de pH concomitante sur cette souche : on remarque nettement la chute de ce pH qui traduit l'assimilation des sucres et sa remontée qui signifie l'utilisation des protéines.

Si l'on calcule le rendement glucose de cette courbe on trouve une valeur de 48,2 % au temps t correspondant à l'optimum de croissance. On peut néanmoins s'interroger sur la rigueur de ce rendement car il existe dans notre milieu d'autres sources de carbone qui se trouvent en très petites quantités.

Nous avons voulu savoir si une croissance était possible en l'absence de glucose pour notre souche *Aspergillus alliaceus*. Les Figures IV.3 et IV.4 mentionnent respectivement les croissances moyennées et leurs pH pour le milieu standard, le même milieu mais sans glucose et un milieu ne contenant que du glucose. On constate que le milieu sans glucose permet une croissance modeste de notre souche. Un milieu ne contenant que du glucose ne permet pas de croissance. La Figure IV.4 montre une bonne corrélation entre les valeurs de pH et les croissances observées. En effet, l'évolution du pH pour le milieu sans glucose montre l'utilisation des protéines puisqu'il n'y a que très peu de sucres présents, contenus dans les éléments composant notre milieu.

Ces courbes confirment la possibilité de croissance sur un milieu ne contenant pas de sucres. La souche semble s'adapter très vite au milieu par modification de l'assimilation des éléments nutritifs. On peut considérer aussi que le peu de sucres présents au départ contribue au démarrage de cette souche.

Le rendement glucose peut, en toute rigueur, être calculé à condition de bien le préciser. Dans ce cas, notre rendement de 48,2% est tout à fait honorable. Pour tenter de connaître un rendement général de croissance par rapport aux hydrates de carbone totaux, on estime leur quantité dans chaque composant de notre milieu dont la composition est donnée par le fabricant. Ainsi on a déterminé :

- * Glucose = 20 g
- * Biosoyase = 5 g x 37% soit 1,85 g
- * Extrait de levure = 5 g x 16,6% soit 0,83 g

Le total nous donne une valeur de 22,68 g par litre de culture, donc de 0,567 g pour un erlenmeyer de 25 ml.

Le rendement hydrates de carbone totaux est donc de

$$R = \frac{241 \text{ mg} \times 25 \text{ ml}}{567 \text{ mg} \times 25 \text{ ml}} \text{ soit } R = 42,5\%$$

Les valeurs de rendements que nous avons trouvées nous semblent dans une bonne gamme de valeurs et prouvent la qualité du milieu de culture trouvé. On peut noter ici que les valeurs de croissance obtenues pour la souche *Cunninghamella echinulata* sont du même ordre de grandeur.

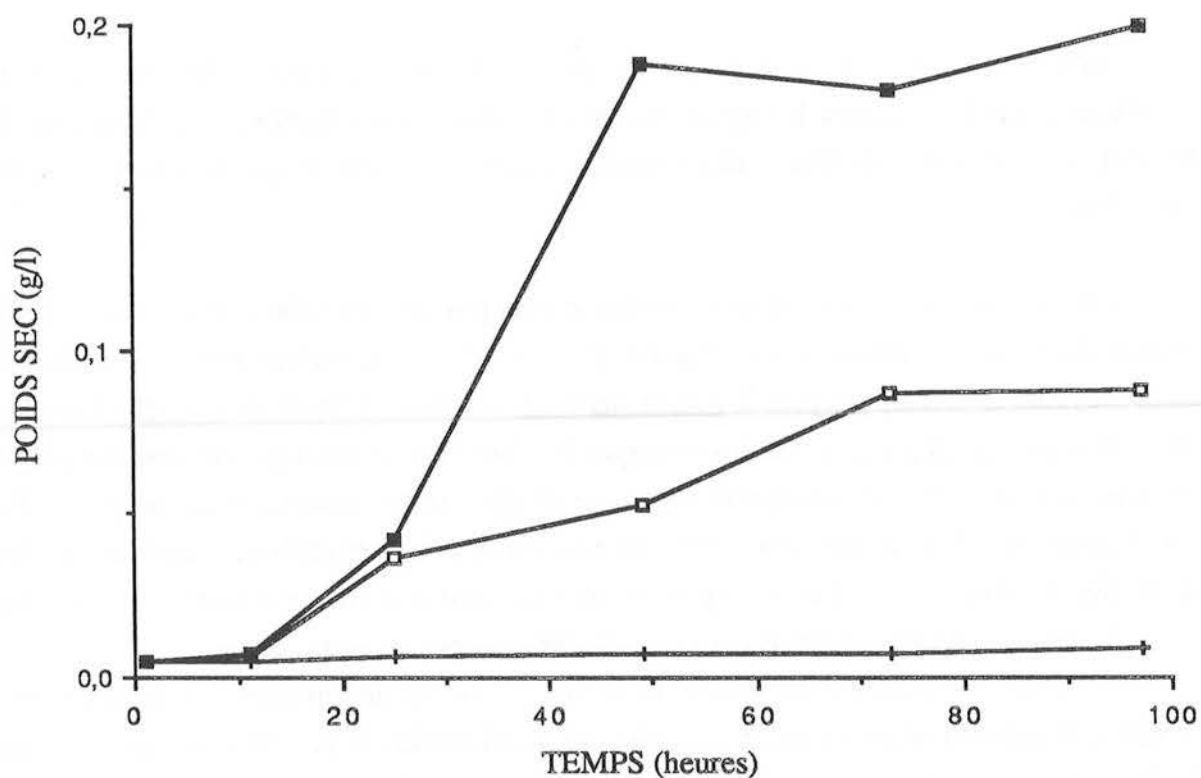


FIGURE IV.3 : CROISSANCE EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE GLUCOSE.

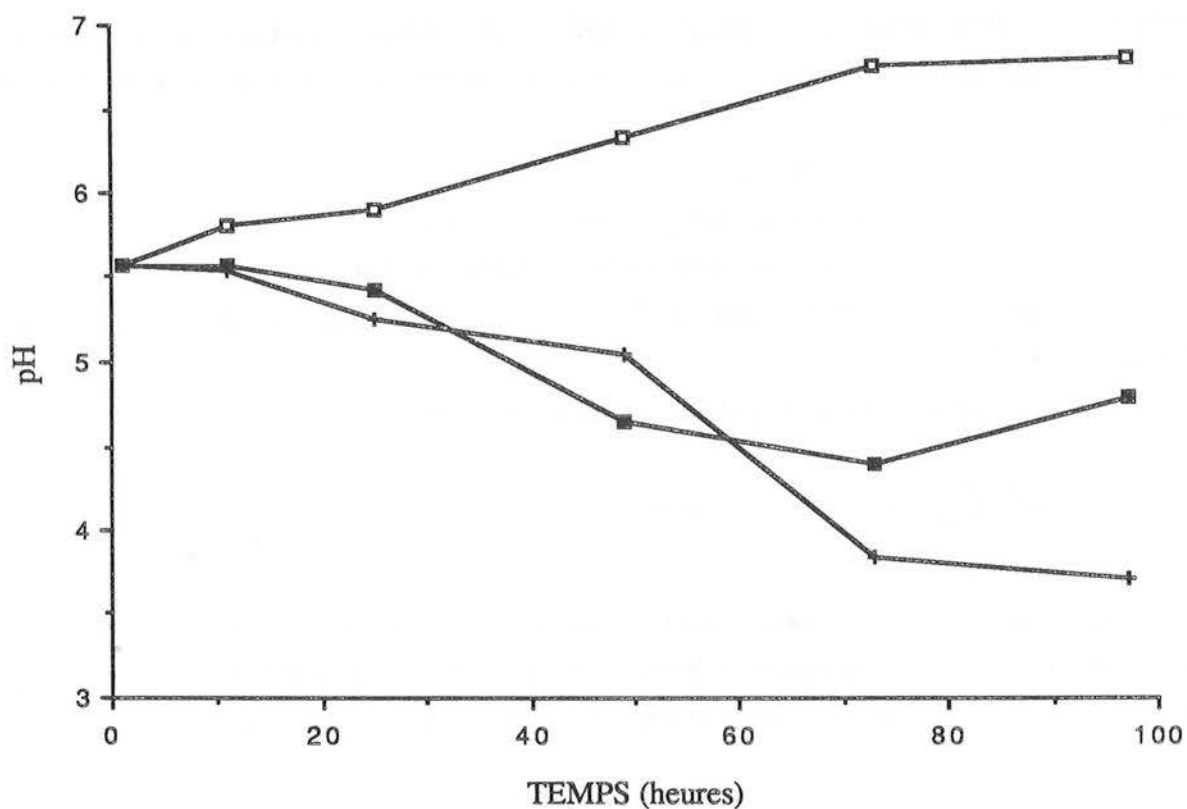


FIGURE IV.4 : VALEURS DU pH DES CULTURES.

(+) : Milieu sans Extrait de levure et Biosoyase ; (□) : Milieu sans Glc; (■) : Milieu normal.

IV.1.1.2 - Influence des paramètres physiques

Aération : C'est certainement le facteur le plus important après la température et le pH. Dans des flacons de culture comme ceux utilisés, le champignon ne dispose que de l'air filtré passant par diffusion. Cela apparaît donc comme le facteur limitant des cultures en erlenmeyers non étudié dans de telles cultures. L'aération doit sensiblement augmenter le taux de croissance μ .

Agitation : Cet autre facteur important joue un rôle non négligeable. On constate, en effet, un ralentissement notable de la croissance lorsque le champignon est maintenu sans agitation. Celle-ci est inférieure de moitié, environ, par rapport à la croissance en milieu agité.

Lumière : Nous n'avons pas décelé d'influence sur la croissance fongique en milieu liquide de la lumière ou de l'obscurité. Ceci semble moins évident dans le cas de culture en milieu solide pour la souche *Aspergillus alliaceus* qui réclame un cycle lumineux circadien pour la production rapide de ses organes de fructification.

IV.1.1.3 - Influence des paramètres chimiques

Nos essais de transformation demande l'introduction dans le milieu de culture de l'Ellipticine. Aussi nous sommes-nous assurés de l'innocuité de l'Ellipticine et de son solvant de solution, le DMF, sur la croissance fongique.

La Figure IV.5 présente les courbes de croissance obtenues dans le cas d'une culture fongique normale et dans le cas d'une culture contenant de l'Ellipticine à raison de $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$ soit $625 \mu\text{g}$ pour un erlenmeyer de 25 ml.

On ne note pas de différences significatives entre les deux courbes de croissance. La phase de latence est relativement longue car nous avons effectué cette expérience en phase I de culture donc dans des conditions non optimales.

De même que pour l'Ellipticine, nous n'avons pas observé d'inhibition de la croissance pour des quantités de DMF inférieures à 10% en volume du milieu de culture.

Ces résultats peuvent s'appliquer à la souche *Cunninghamella echinulata* (CBS 596.68 comme CBS 656.85).

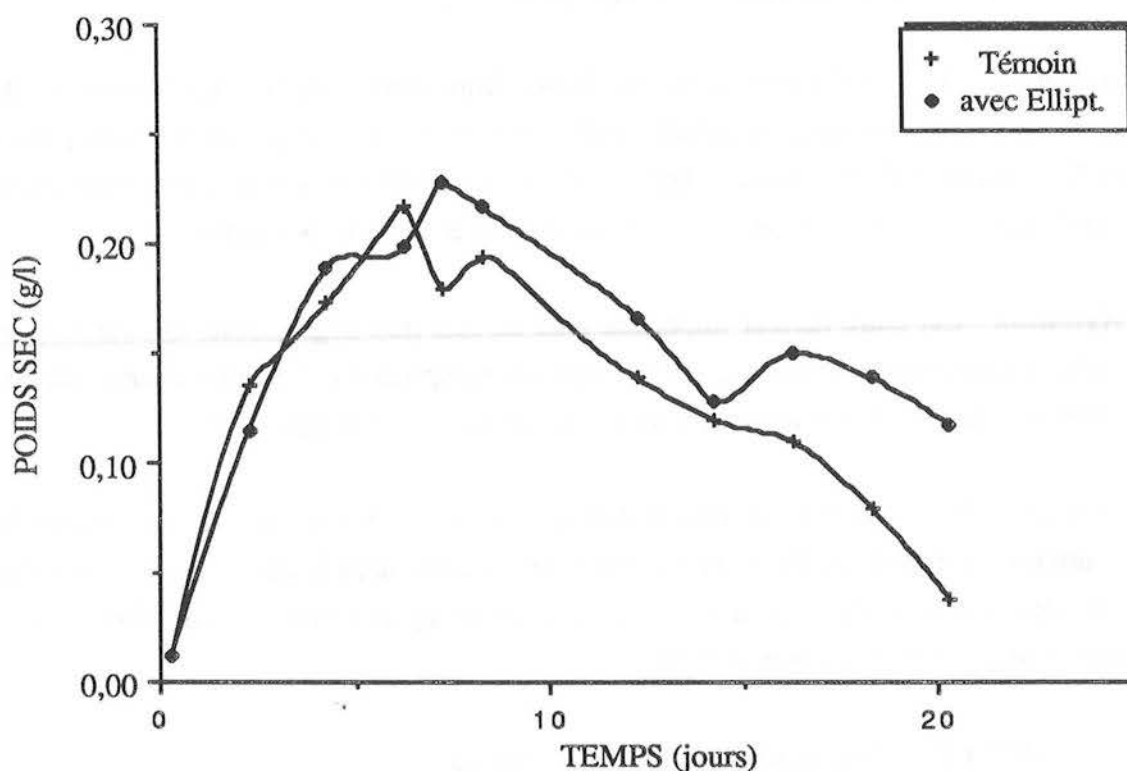


FIGURE IV.5 : INFLUENCE DE L'ELLIPTICINE SUR LA CROISSANCE FONGIQUE. CROISSANCE DE LA SOUCHE SEULE (+) ET EN PRESENCE D'ELLIPTICINE (●).

IV.1.1.4 - Aspect des cultures

Au sein d'erlenmeyers, le champignon soumis à une agitation se met très rapidement en pelotes. Ces pellets peuvent être uniques et énormes, limitant par là tous les phénomènes de transferts nécessaires à une croissance optimale de la souche fongique. Le phénomène apparaît logiquement puisque nous n'avons pas de système interne d'agitation et sommes donc tributaires d'une agitation externe peu maîtrisable. C'est cet aspect qui, en fait, est le plus problématique.

Les pellets formés provoquent ensuite de nombreux phénomènes : l'aérobiose est limitée à la surface, les transferts et notamment la pénétration de l'Ellipticine dans le champignon est donc plus limitée, le broyage devient extrêmement difficile et long entraînant un échauffement de l'ensemble préjudiciable à l'intégrité du système enzymatique, l'extraction souffre de ces agglomérats formés, la mousse apparaît ...etc.

On peut aussi remarquer que la couleur de la culture devient brun-foncée traduisant souvent la présence, à la fin de la phase stationnaire, de phénols formés par la phénol oxydase.

Toutes ces raisons nous ont vite incités à expérimenter nos transformations dans des fermenteurs plus adaptés à la culture de microorganismes. Cependant, auparavant, nous avons voulu vérifier les croissances fongiques obtenues en fermenteur.

IV.1.2 - EXPERIMENTATIONS CONDUITES EN FERMENTEUR

L'obtention d'une biomasse maximale répond toujours à la même préoccupation : améliorer la quantité disponible de matériel enzymatique destiné à la conversion de l'Ellipticine.

Ces fermentations avaient donc pour but de déterminer la concentration optimale du substrat principal, l'aération idéale nécessaire, afin d'obtenir une croissance fongique aussi importante que possible.

IV.1.2.1 - Fermenteur "classique"

Les fermentations que nous avons menées en fermenteur classique ne nous ont pas donné entière satisfaction. Effectivement, si la biomasse fongique obtenue était de quantité tout à fait importante (14,5 g.l⁻¹ au maximum de croissance à 60 heures), l'aspect de la culture mycélienne était en revanche loin d'atteindre une homogénéité parfaite. Nous retrouvons là les phénomènes de formation de pellets dont nous avons déjà parlé précédemment.

Les cultures de champignons rencontrent de nombreuses difficultés dont la principale, la formation de pelotes de mycélium limitant les transferts de matières, paraît difficilement évitable. Connaissant l'intérêt des industriels pour le développement de nouveaux réacteurs minimisant ces phénomènes nous avons pu expérimenter, dans le cadre d'une collaboration avec l'Université Technique de Berlin, un réacteur pilote dont nous avons détaillé le principe (cf.chapitre II).

L'étude de notre procédé sur un tel réacteur présentait plusieurs avantages : tenter d'améliorer l'homogénéité des souches fongiques cultivées en éliminant la formation de pellets, expérimenter un procédé biologique sur un réacteur dont le principe novateur retenait l'attention et accroître les rendements de croissance dans un but beaucoup plus large : production de métabolites, bioconversions, production d'enzymes.

IV.1 2.2 - Réacteur "pulsé"

Comme pour l'étude faite en erlenmeyers, nous avons d'abord travaillé avec la souche *Aspergillus alliaceus* avant de confirmer ou d'infirmier les résultats avec la souche *Cunninghamella echinulata*.

IV.1.2.2.1 - Résultats avec la souche *Aspergillus alliaceus*a) Influence de la concentration de glucose et de l'aération sur la croissance fongique

La Figure IV.6 représente l'évolution du poids sec de la souche *Aspergillus alliaceus* en fonction du temps pour six expérimentations conduites selon les conditions (concentration de glucose dans le milieu de culture et aération du milieu) mentionnées dans le Tableau IV.1.

Expérimentations	Glucose (g.l ⁻¹)	Aération (m ³ .h ⁻¹)
Aa 1	15	0,91
Aa 2	15	0,91
Aa 3	10	0,91
Aa 4	30	0,91
Aa 5	15	0,70
Aa 6	15	2,53

TABLEAU IV.1 : PARAMETRES DES 6 PREMIERES FERMENTATIONS POUR LA SOUCHE *ASPERGILLUS ALLIACEUS* (notée Aa).

(Aa1 - Aa6) (Fréquence : 0,65 Hz ; Température : 24°C ;
pH : 5,6 en début de fermentation)

Les Figures IV.7, IV.8, IV.9 présentent les différents paramètres suivis lors de nos fermentations : le pH, le taux de glucose résiduel dans le milieu de culture (ce glucose résiduel a été déterminé par le test enzymatique de la glucose oxydase de chez Bœhringer® par spectrophotométrie), le pourcentage de saturation en oxygène de l'air pour le milieu de fermentation.

b) Reproductibilité des expérimentations

Les cinq expériences suivantes (Aa11 à Aa17), ont été faites dans les conditions opératoires précisées ci-dessous :

- Température = 24°C
- Fréquence = 0,65 Hz
- Aération (pour le milieu total) = 2,53 m³.h⁻¹, sauf pour Aa 15 et Aa 17 : 2,16 m³.h⁻¹.
- Concentration de Glucose = 20 g.l⁻¹
- pH = 5,6 en début de fermentation.

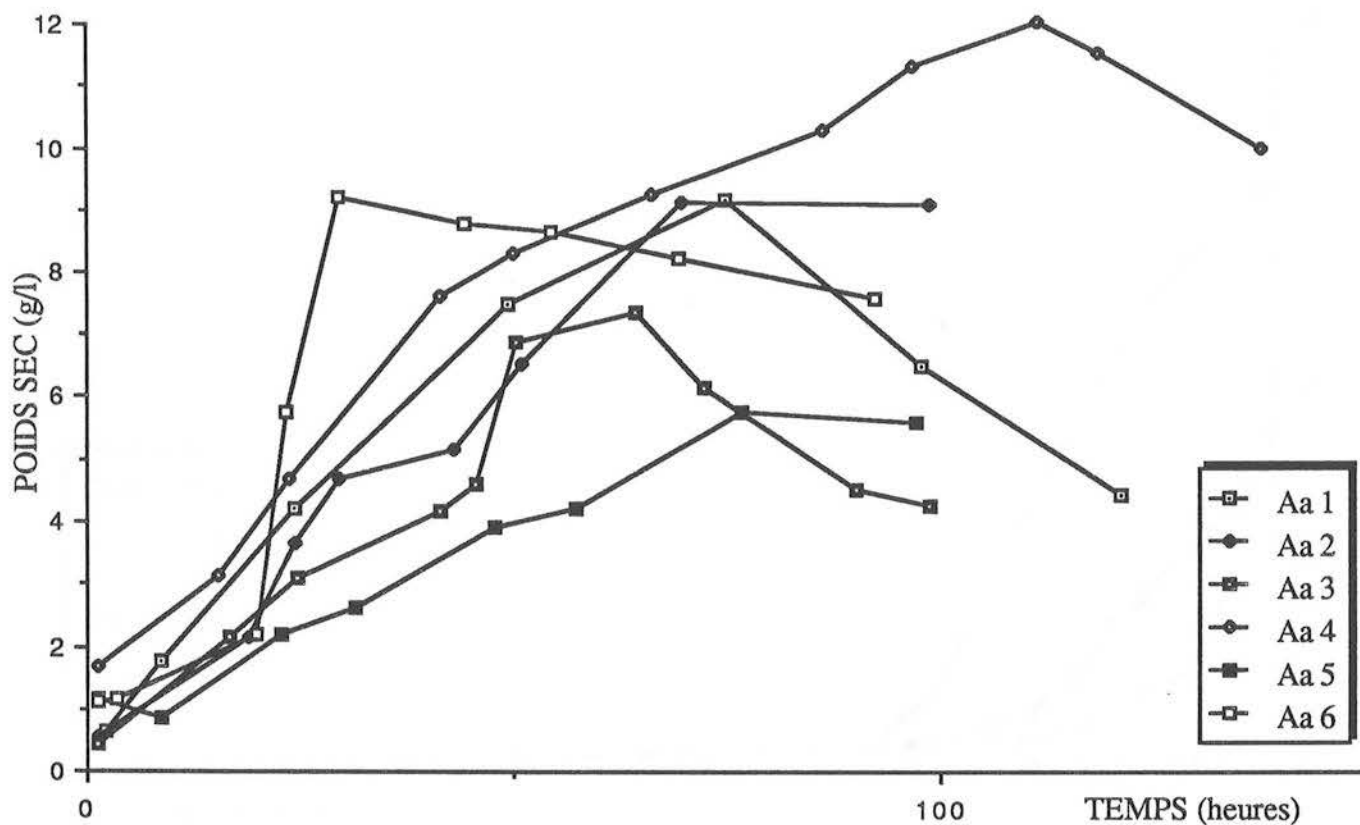


FIGURE IV.6 : POIDS SECS OBTENUS SELON L'AERATION ET LE TAUX DE GLUCOSE.

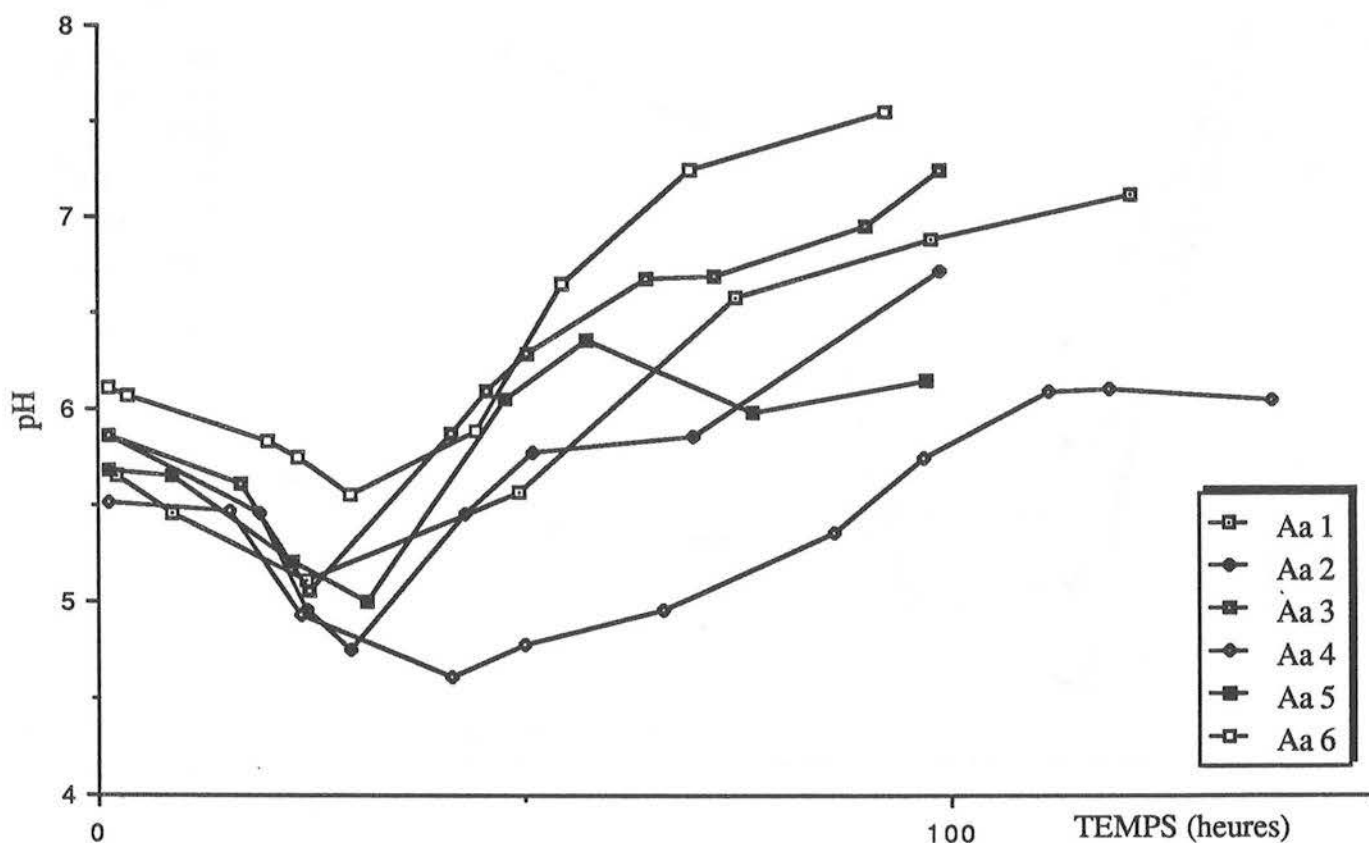


FIGURE IV.7 : VALEURS DE pH OBSERVEES.

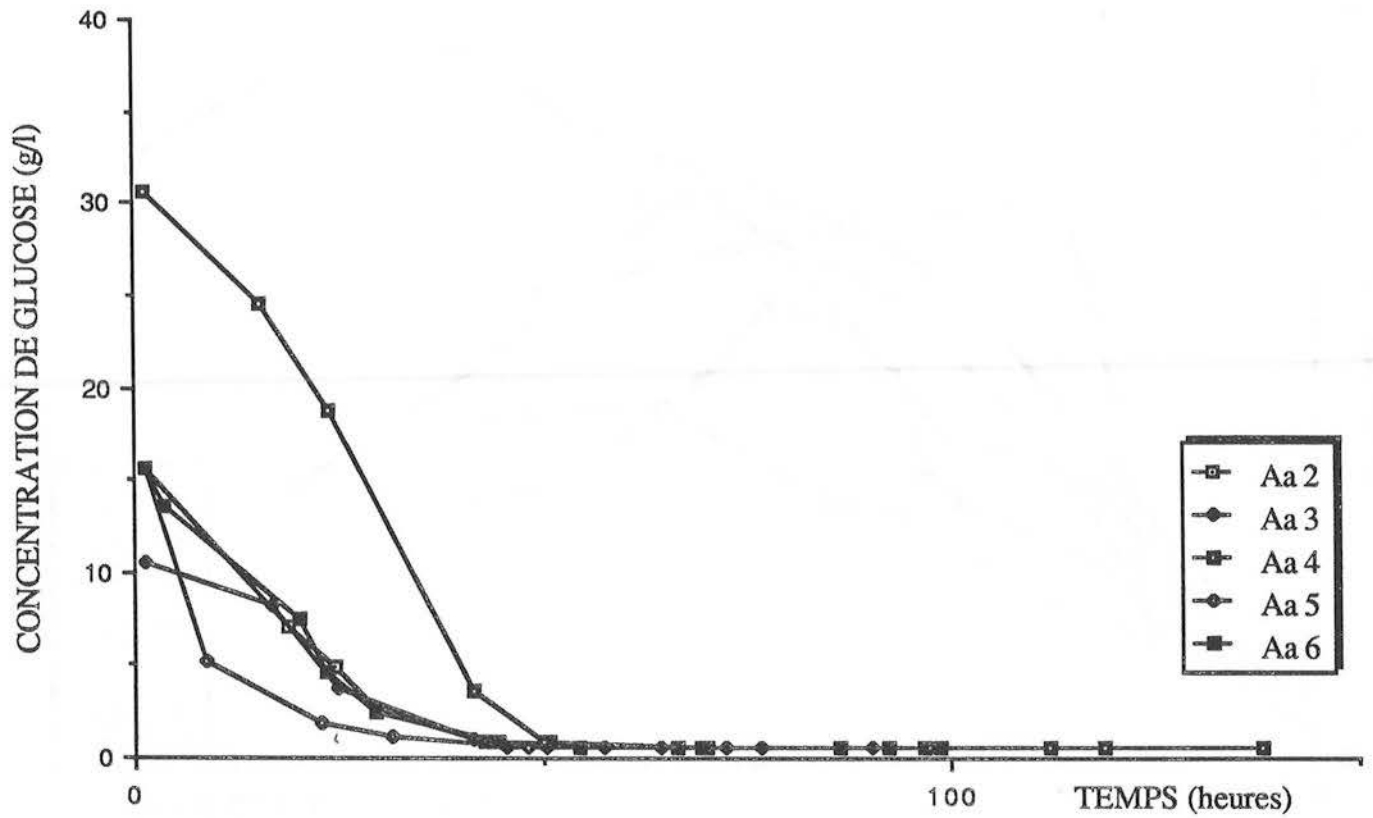


FIGURE IV.8 : GLUCOSE RESIDUEL DOSE.

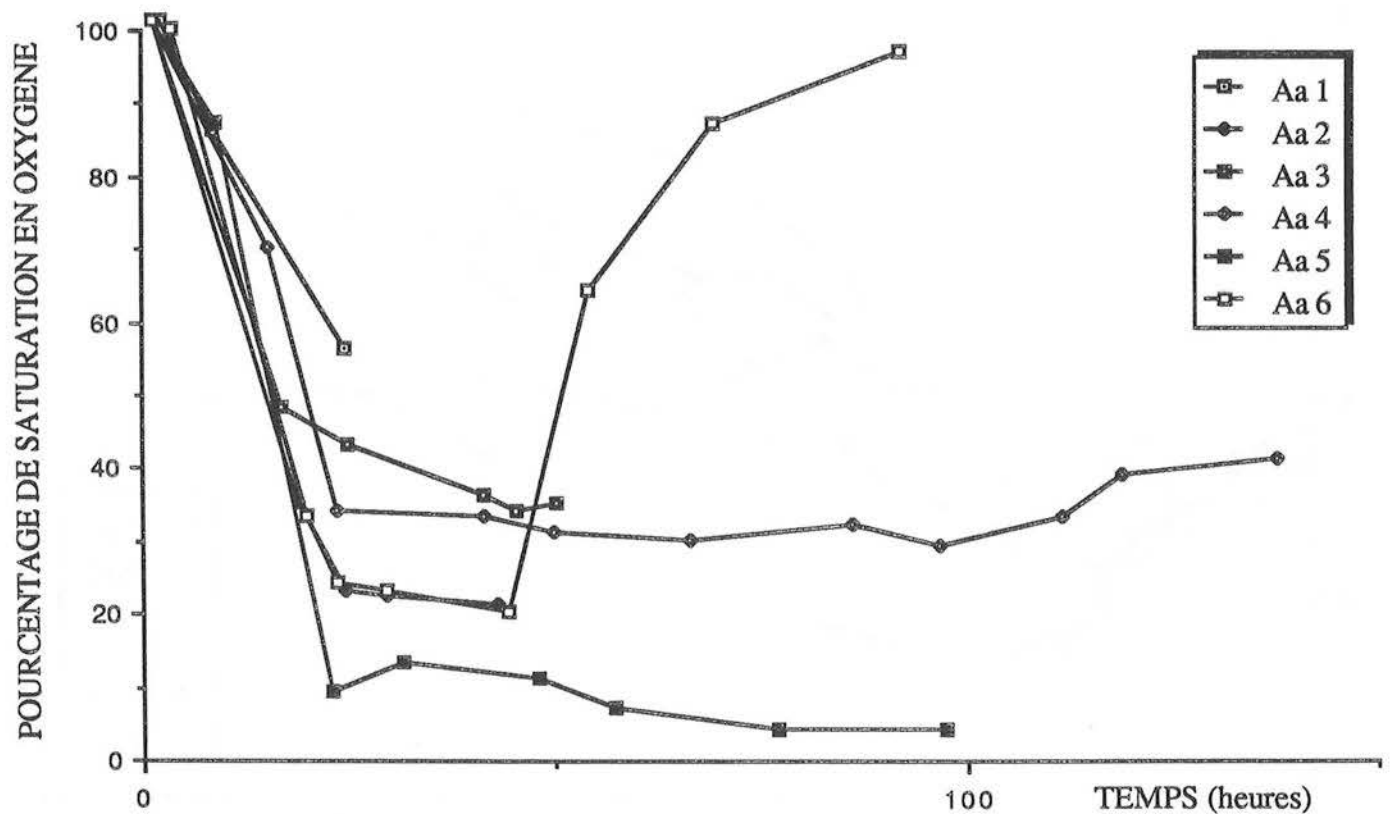


FIGURE IV.9 : SATURATION EN OXYGENE (%).

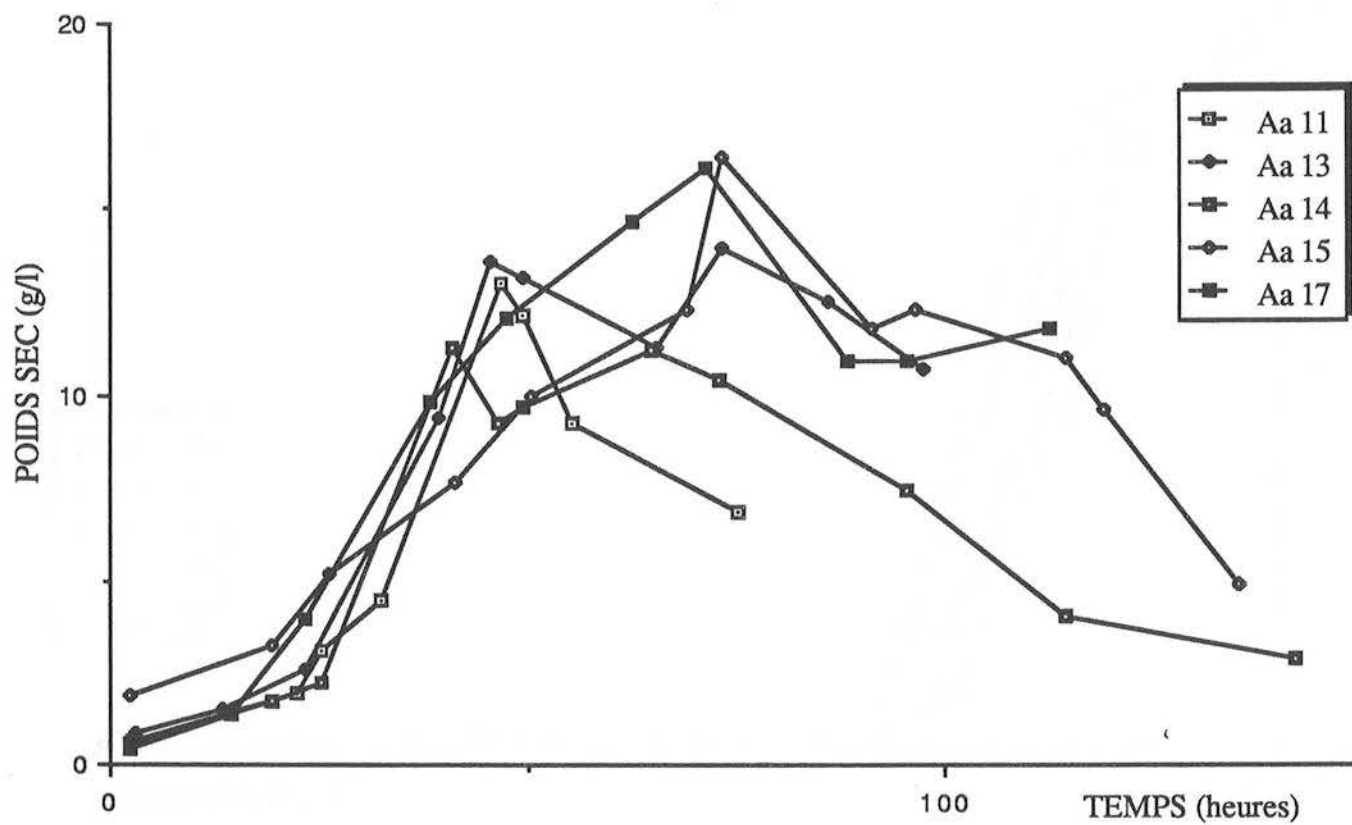
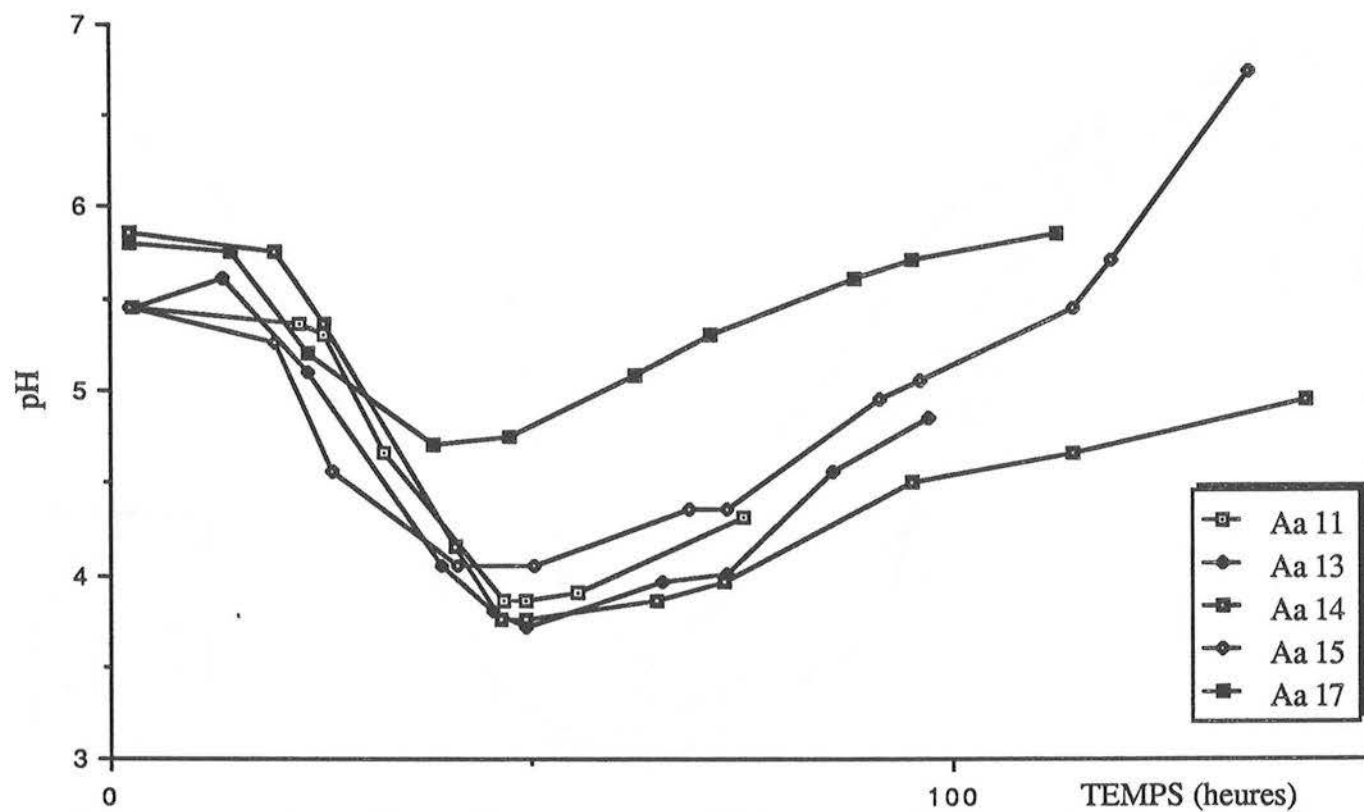
FIGURE IV.10 : COURBES DE CROISSANCE OBTENUES (Glc : 20 g.l⁻¹).

FIGURE IV.11 : VALEURS DE pH MESUREES.



FIGURE IV.12 : GLUCOSE RESIDUEL DOSE.

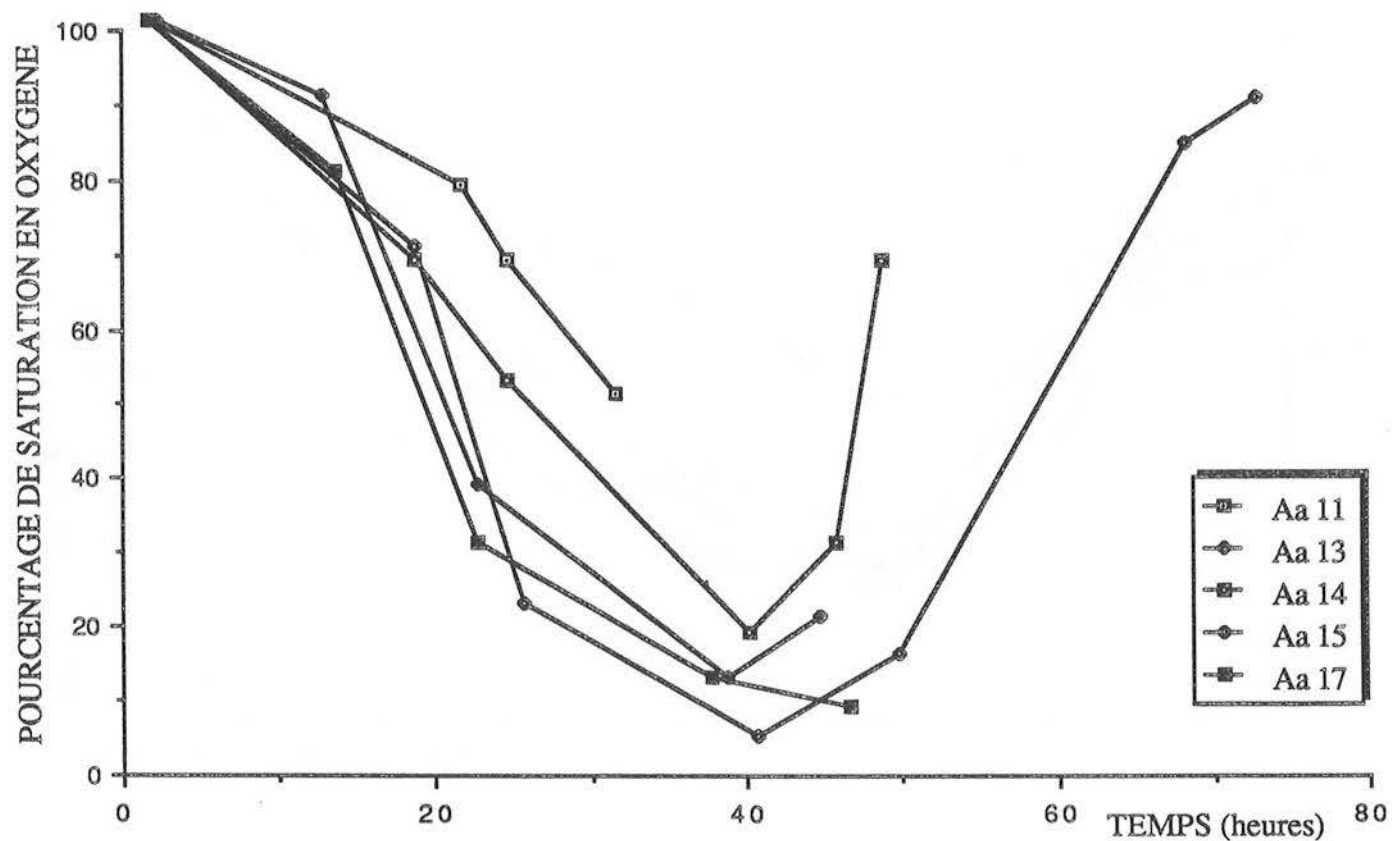


FIGURE IV.13 : SATURATION EN OXYGENE (%).

La Figure IV.10 (Aa11 à Aa17) montre que l'on obtient une croissance optimale en 48 ou 72 heures, selon l'inoculum et l'aération, qui atteint 11 à 16 g.l⁻¹ de poids sec.

La Figure IV.11 présente pour ces mêmes expérimentations l'évolution du pH.

Les Figures IV.12 et 13 tracent les deux derniers paramètres de nos fermentations : la cinétique du glucose résiduel dans le milieu de fermentation et la saturation du milieu en pourcentage d'oxygène de l'air.

IV.1.2.2.2 - Résultats avec la souche *Cunninghamella echinulata*

Deux fermentations ont été effectuées avec cette souche. Le milieu de culture est le même que celui utilisé précédemment. Les conditions opératoires sont identiques à celles précédemment définies sauf l'aération et la fréquence fixée respectivement à 0,5 m³.h⁻¹ et 0,56 Hz.

La Figure IV.14 présente l'évolution de la biomasse fongique.

La Figure IV.15 montre l'évolution du pH en fonction du temps, la Figure IV.16 nous définit le glucose résiduel dans le milieu de culture et la Figure IV.17 nous précise la saturation du milieu en pourcentage de l'oxygène de l'air.

Nous allons maintenant analyser et comparer ces résultats.

IV.1.2.2.3 - Discussion

Nous allons tenter une approche conjointe des résultats obtenus pour les deux souches. Dans un premier temps, nous discuterons des résultats se dégageant des expérimentations faites pour la détermination des meilleurs paramètres de fermentation. Ensuite, nous détaillerons les expériences faites pour les deux souches dans les conditions précédemment définies.

a) - Variation de la fréquence d'agitation

En ce qui concerne notre souche de Deutéromycètes, *Aspergillus alliaceus*, nous avons opté immédiatement pour une fréquence comprise entre 0,5 et 0,7 Hz. Ce choix a été motivé par les recherches faites sur une souche fongique analogue au sein du laboratoire de Génie des Procédés du professeur Brauer. La fréquence de 0,65 Hz a été retenue à la suite d'expériences ponctuelles nous ayant démontré que cette fréquence était dans une plage optimale de travail.

Pour la souche *Cunninghamella echinulata*, la fréquence d'agitation fixée à 0,56 Hz est la fréquence optimale pour des souches fragiles ou poussant lentement comme les Basidiomycètes. Ainsi, avons-nous pensé que cette fréquence était intéressante pour étudier ponctuellement la croissance de notre souche de Mucorale, sachant qu'une optimisation ultérieure serait toujours possible.

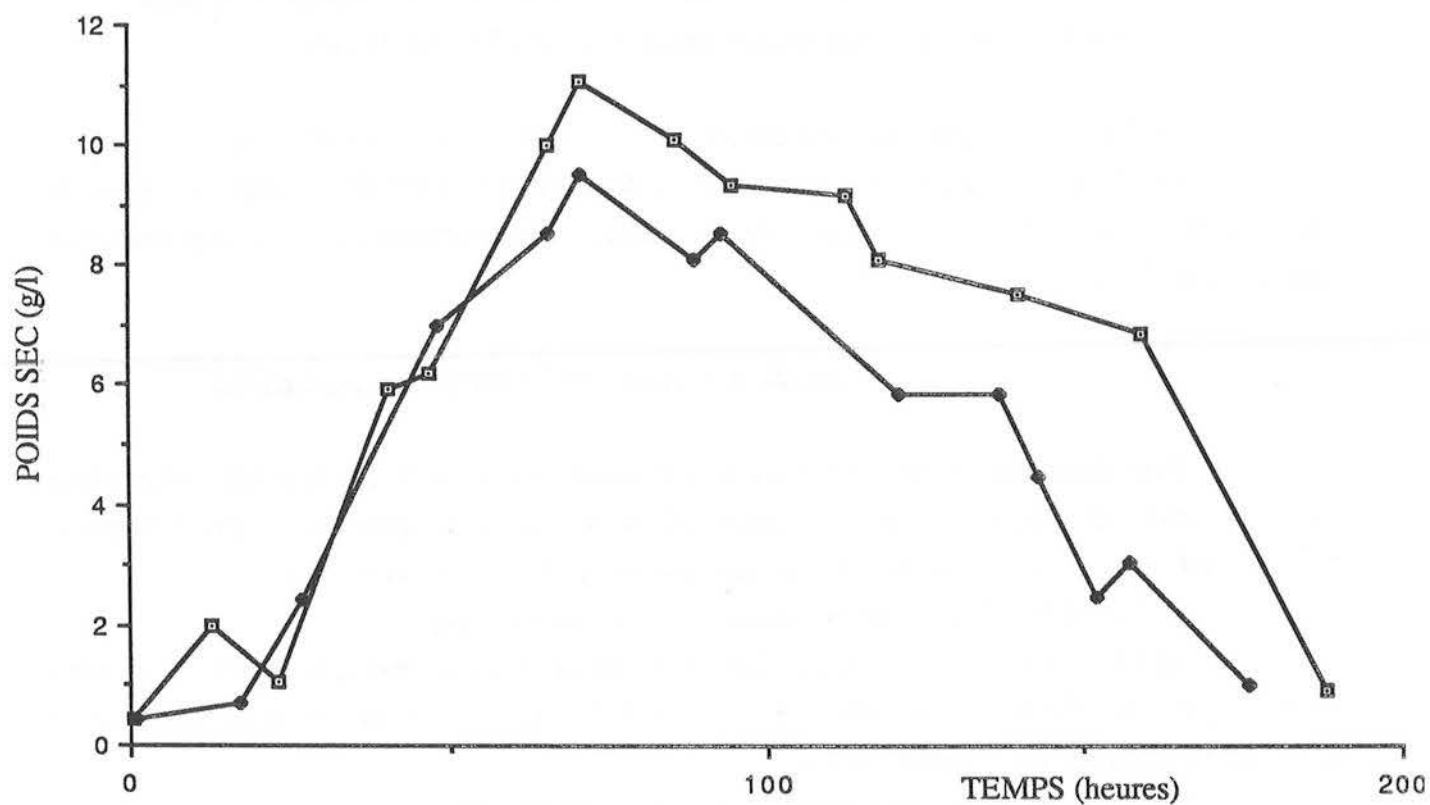


FIGURE IV.14 : COURBES DE CROISSANCE (*Cunninghamella echinulata*).

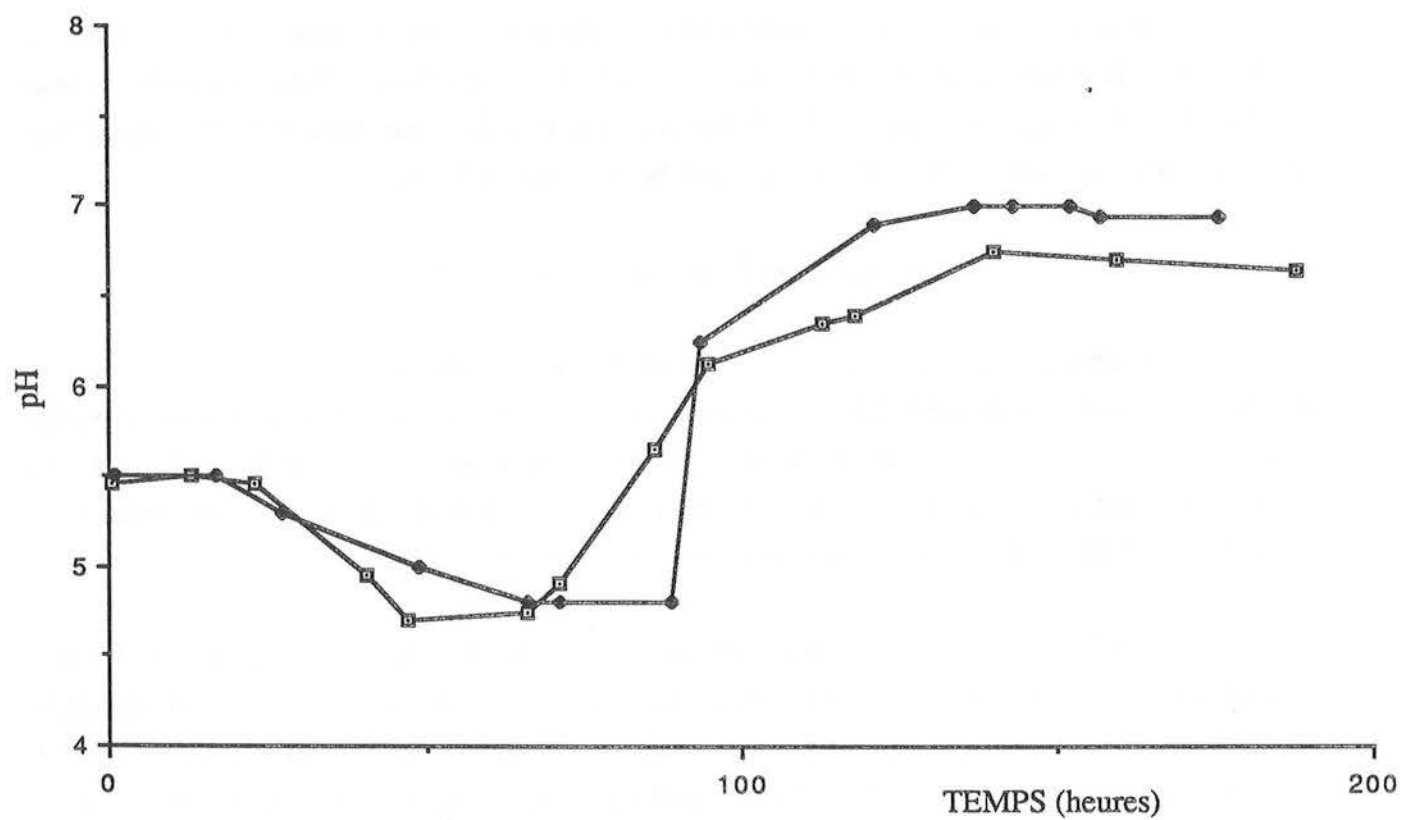


FIGURE IV.15 : VALEURS DE pH MESUREES (*Cunninghamella echinulata*).

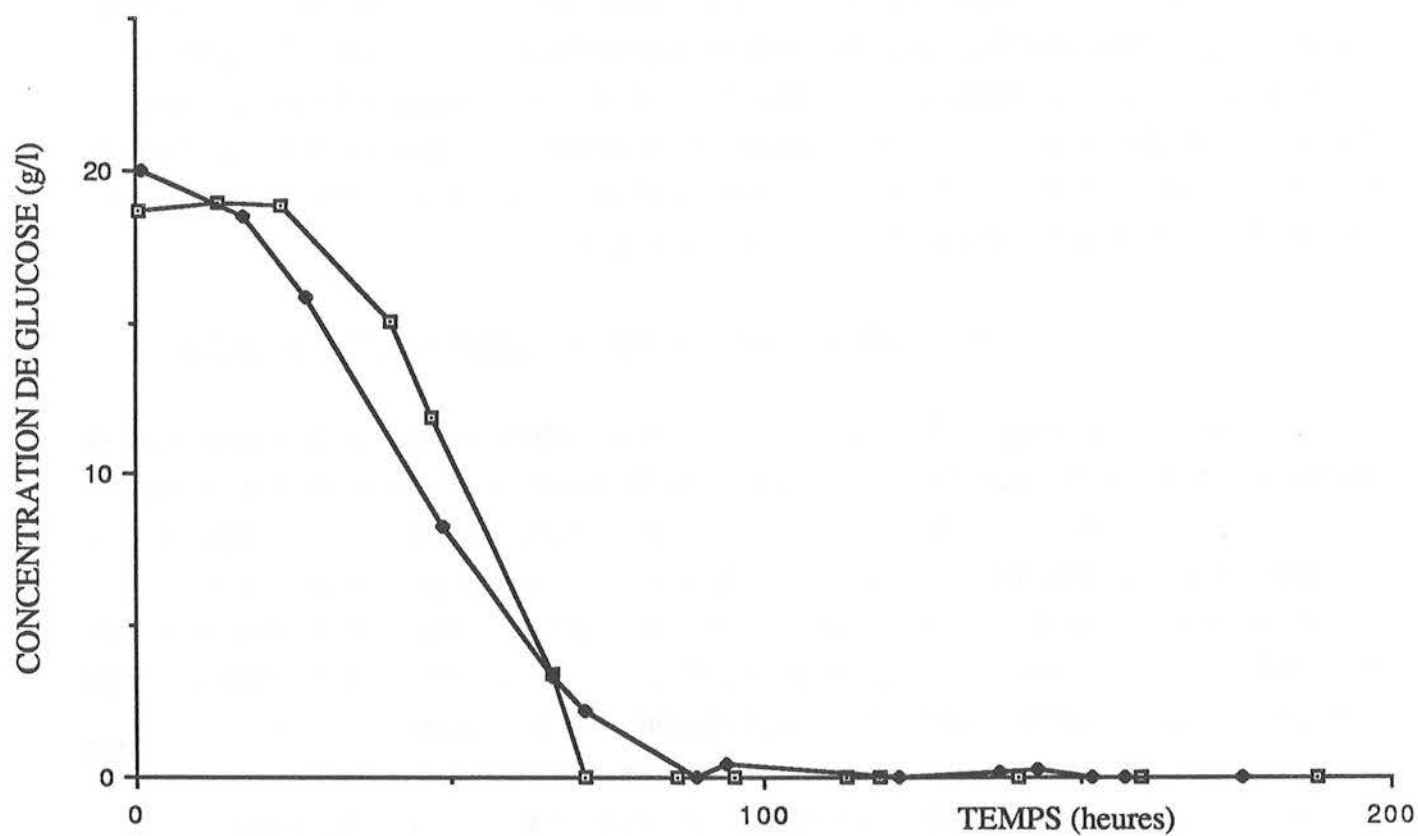


FIGURE IV.16 : GLUCOSE RESIDUEL DOSE (*Cunninghamella echinulata*).

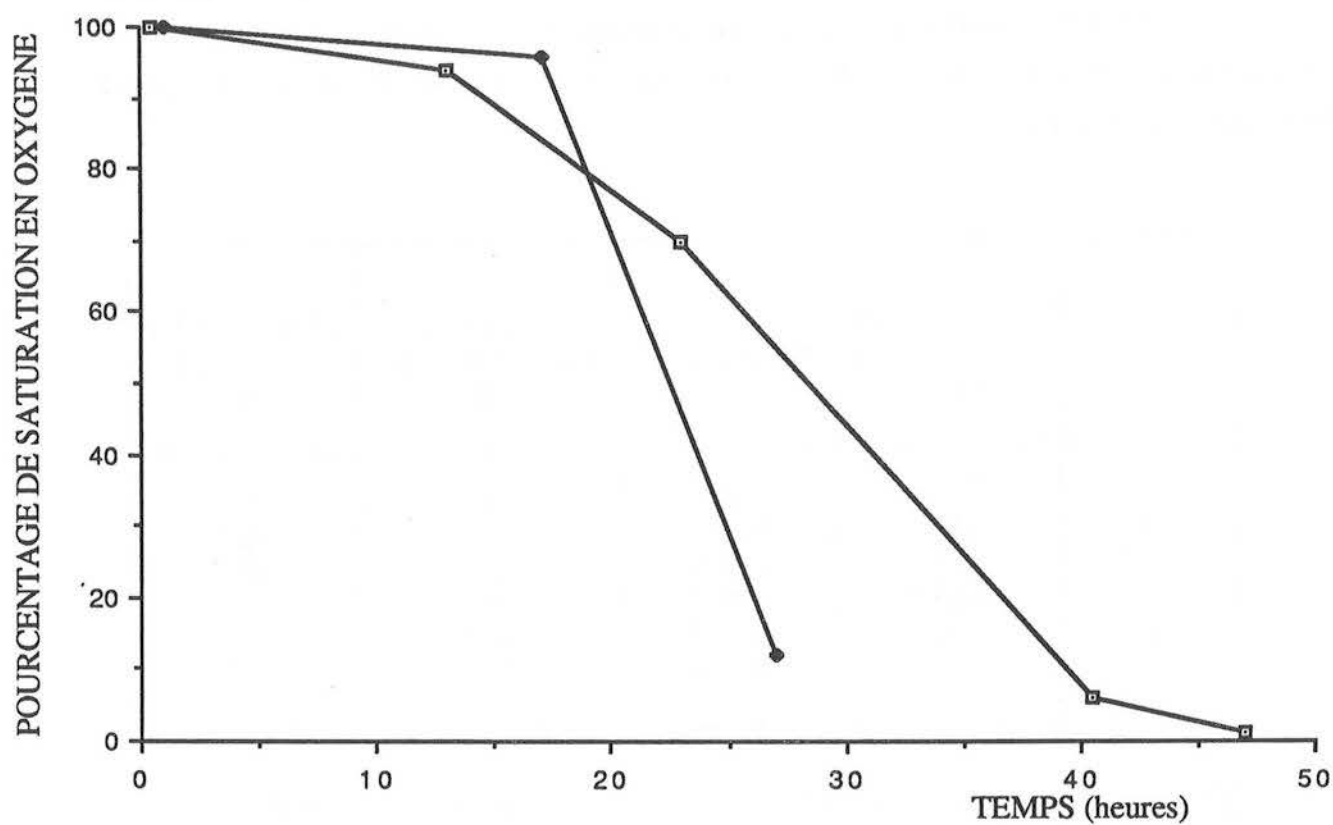


FIGURE IV.17 : SATURATION EN OXYGENE (*Cunninghamella echinulata*).

Néanmoins, diverses observations sur plusieurs essais de fréquence nous ont conduits à formuler l'hypothèse selon laquelle, une faible fréquence limiterait le transfert d'oxygène donc limiterait la croissance alors qu'une fréquence trop élevée traumatiserait le microorganisme qui trouverait ainsi des conditions extrêmes d'agitation et ne pourrait donc pas se développer. En effet, pour une fréquence trop élevée, les phénomènes diffusifs et convectifs sont particulièrement atténués, notamment en ce qui concerne le transport d'oxygène.

b) - Variation de la concentration du substrat dans le milieu de culture

Sur la souche *Aspergillus alliaceus*, nous avons étudié la variation de la concentration de glucose sur la croissance de ce champignon. La Figure IV.6 nous montre les poids secs en fonction du temps. Le Tableau IV.1 nous rappelle les conditions opératoires de ces fermentations. On constate que la croissance fongique est fonction de la concentration en glucose (Aa 1 à Aa 4). Pour 30 g.l⁻¹ de glucose, le poids sec atteint est de 12 g.l⁻¹, alors que pour 15 g.l⁻¹ de glucose, on obtient environ 9 g.l⁻¹ de biomasse fongique. Tandis que 10 g.l⁻¹ de glucose permettent l'obtention d'une biomasse de 7 g.l⁻¹. On observe une faible reproductibilité entre les courbes Aa1 et Aa2.

On remarque après observation attentive du graphique que la meilleure croissance se situe lorsque l'on a une concentration comprise entre 15 et 25 g.l⁻¹ de glucose. Nous avons choisi 20 g.l⁻¹ de glucose parce que, d'une part il correspond à une plage de concentration de substrat intéressant pour la croissance et, d'autre part, parce qu'il permettra ultérieurement de comparer les résultats donnés par l'"Hubstrahlbioreaktor" et les résultats obtenus sur les cultures en erlenmeyers.

Le Tableau IV.2 résume les taux de croissance comparés et les rendements glucose de la série d'expériences Aa1 à Aa6. Pour les calculs, nous nous sommes fixés dans les phases exponentielles de croissance.

EXP. N°	OPTIMUM DE CROISSANCE (heures)	TAUX DE CROISSANCE μ (h ⁻¹)	TEMPS DE GENERATION T(h)	RENDEMENT GLUCOSE (%)
Aa 1	73,5	0,071	9	56,8
Aa 2	68,5	0,069	10	56,9
Aa 3	63	0,054	12,8	69,5
Aa 4	110,5	0,062	11,2	34,6
Aa 5	75,5	0,060	11,5	32,4
Aa 6	28	0,326	2,1	54

**TABLEAU IV.2 : TAUX DE CROISSANCE ET RENDEMENT GLUCOSE DES
EXPERIMENTATIONS Aa1 à Aa6.**

On remarque très nettement sur ce tableau la similitude des faibles taux de croissance μ pour les quatre premières expérimentations dont l'aération était limitée. Néanmoins, les rendements glucose sont intéressants pour des concentrations de glucose de 15 g.l^{-1} et confirment que la concentration de glucose de 20 g.l^{-1} choisie correspond à une concentration quasi-optimale.

En outre, sur le Tableau IV.2 et la Figure IV.6, on constate que la croissance atteinte pour les expérimentations Aa1 à Aa4 sont relativement lentes : 3 à 4 jours minimum sont nécessaires même si leurs taux de croissance sont très reproductibles. De plus, on peut remarquer que le taux de croissance μ est indépendant du rendement glucose.

Par ailleurs, l'influence d'un facteur comme l'aération est certainement très importante.

c) - Influence de l'aération

Toujours sur cette Figure IV.6, les deux dernières expérimentations que nous avons faites (Aa 5 et Aa 6) montrent que l'aération permet un gain de productivité important.

Nous obtenons, en effet, avec $2,53 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ (soit $42,2 \text{ l.min}^{-1}$ pour le milieu entier et dans nos conditions de pression et de débit) une croissance optimale atteinte dès 48 heures (Aa6). Au contraire, dans les mêmes conditions de fermentation et avec la même concentration en glucose, la courbe Aa5 présente une croissance lente et limitée. Les valeurs calculées sur le Tableau IV.2 montrent que la multiplication par 3 de l'aération multiplie par 5 environ le taux de croissance. Le rendement glucose se situe encore au dessus de 50%, ce qui est tout à fait honorable. Une aération plus élevée que $2,53 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ était difficilement supportable par l'installation car nous ne pouvions évacuer un débit d'air supérieur. De plus, quelques expériences ponctuelles n'ont amélioré ni la productivité ni la croissance.

On peut déjà apprécier ainsi le fait que le procédé de transfert d'air dans le réacteur que nous développons est un facteur significatif contribuant à son efficacité. Une augmentation du transfert gazeux permet un gain de productivité appréciable confirmé par les calculs effectués.

d) - Fermentations effectuées

Les figures IV.10 à IV.13 nous décrivent l'évolution des différents paramètres de 5 fermentations concernant *Aspergillus alliaceus*.

L'analyse de ces différentes courbes montre d'abord une assez bonne reproductibilité des expériences. La Figure IV.10 montre une phase exponentielle pratiquement identique pour les 5 expérimentations conduites. Les variations observées après cette phase sont souvent inhérentes à un système vivant et dépendent de la qualité et de la quantité de l'inoculum. La croissance maximale est

obtenue dès 48 heures et se situe entre 48 et 72 heures pour certaines expériences. On doit aussi tenir compte des autres paramètres afin d'établir une corrélation. Ainsi peut-on faire sur les Figures IV.11 à IV.13 plusieurs remarques :

1/ Le pH (Figure IV.11) atteint un minimum après une chute rapide et importante à partir de sa valeur de départ. Il est très bien corrélé à la croissance fongique car une chute de pH signifie l'utilisation intense du glucose tandis que sa remontée prouve l'assimilation métabolique des protéines.

2/ Le taux de glucose résiduel (Figure IV.12) décroît très rapidement et correspond, lorsqu'il est nul, au maximum de croissance. Ce taux de glucose est systématiquement nul avant 50 heures quelle que soit la souche et les conditions opératoires, notamment l'aération.

3/ La saturation en oxygène (Figure IV.13) arrive à un minimum quelques heures avant l'obtention du poids sec maximum ; l'expérience Aa11 ne permet pas une analyse fine car l'électrode trop courte n'était plus en contact avec la solution.

Le Tableau IV.3 présente les différents calculs établis sur la base de nos résultats et en fonction de la détermination de la concentration en glucose du milieu et de l'aération au cours des précédentes expérimentations. Plusieurs précisions doivent être apportées à la façon dont ont été faits ces calculs.

* D'abord, les valeurs ont été calculées de deux façons : pour respecter une comparaison globale et étant donné que les temps de mesure diffèrent, nous avons décidé de prendre en considération la phase de latence peu perceptible et la phase de croissance pour le calcul d'une première série de valeurs. Ceci prendra en compte, de surcroît, les différences affectant l'inoculum ainsi que les conditions opératoires.

* Puis, ensuite, prendre uniquement la phase exponentielle de croissance pour une deuxième série de valeurs. Néanmoins cette dernière méthode entraîne, selon nous, l'inclusion d'un biais dans les calculs ainsi que des erreurs d'appréciation importantes et ne nous semble pas refléter exactement la réalité.

Le Tableau IV.3 montre que les taux de croissance obtenus sont du même ordre que celui obtenu pour l'expérimentation Aa6 : seule l'aération peut jouer sur le délai d'obtention du maximum de croissance (courbe Aa15 et Aa17). Les rendements ne semblent pas affecter par une diminution de l'aération. Il apparaît que l'on peut, en fait, moduler deux facteurs, l'aération et le milieu de culture, pour obtenir le meilleur rendement avec le meilleur taux de croissance.

On peut donc déjà affirmer que le taux de croissance μ atteint par notre champignon est une bonne valeur tandis que son rendement glucose ou hydrates de carbone totaux est bon, bien que ces deux éléments ne soient pas liés.

EXP. N°	OPTIMUM DE CROISSANCE (heures)	TAUX DE CROISSANCE		TEMPS DE GENERATION		RENDEMENT	
		μ_1 (h ⁻¹)	μ_2 (h ⁻¹)	T1 (h)	T2 (h)	GLUCOSE (%)	H.C TOTAUX (%)
Aa 11	45,5	0,82	0,28	0,83	2,5	61,8	54,5
Aa 13	44	0,535	0,31	1,33	2,3	63,7	56,2
Aa 14	39,5	0,915	0,3	0,75	2,3	53,5	47,2
Aa 15	72	0,128	0,08	5,4	8,5	72,6	64
Aa 17	70	1,26	0,23	0,6	3,0	78,3	69
Ce 1	71	0,34	0,20	2,0	3,5	53,1	46,8
Ce 2	71	0,28	0,23	2,5	3,0	45	39,8

TABEAU IV.3 : RESULTATS COMPARES DES EXPERIMENTATIONS Aa11 à Aa17 et Ce1 à 2.

Bien qu'un compromis idéal soit encore à rechercher, la souche *Aspergillus alliaceus* a donc prouvé qu'elle pouvait produire une bonne biomasse au sein d'un tel type de réacteur. Il sera cependant intéressant de connaître les résultats des transformations pour savoir si l'augmentation conséquente de la biomasse au moyen d'un tel réacteur peut favoriser une bioconversion.

Les résultats obtenus pour la deuxième souche, *Cunninghamella echinulata* (souche CBS 656.85), bien que peu nombreux, montrent une croissance moyenne avec des valeurs de taux de croissance plus faibles que celles observées pour la souche *Aspergillus alliaceus*. Les rendements semblent, en revanche, faibles donc potentiellement optimisables.

A partir de données précédemment établies pour d'autres souches, nous sommes donc arrivés à atteindre une biomasse correcte. Il est évident qu'une étude plus complète sur cette souche permettrait certainement l'obtention de résultats beaucoup plus significatifs. On remarque tout de même une certaine similarité des résultats sur les différents paramètres de la fermentation (Figures IV.14 à IV.17).

e) Aspect qualitatif des fermentations

L'aspect microscopique des champignons en solution liquide dans l'"Hubstrahlbioreaktor" permet de constater la formation réduite de pellets quelle que soit la souche utilisée. La qualité de notre suspension est donc tout à fait optimale pour permettre l'utilisation maximale du potentiel enzymatique de ces champignons. Les hyphes, observées au microscope optique, sont fines et peu sinueuses. Cela traduit leur bonne tenue et un milieu adapté à leur croissance.

L'aspect macroscopique des cultures nous satisfait puisque les pellets formés sont peu nombreux et très petits permettant des transferts de matières optimaux, fondement de ce principe. Le système d'agitation de l'"Hubstrahlbioreaktor" apporte donc une amélioration notable de l'aspect qualitatif des fermentations fongiques.

f) Conclusion

Ainsi, peut-on aisément admettre que l'"Hubstrahlbioreaktor" recèle les caractéristiques nécessaires à la conduite d'un procédé biologique d'efficacité largement démontrée. En effet, le principe d'agitation retenu permet l'optimisation de deux paramètres très importants et liés : le mélange du milieu de culture et du microorganisme ainsi que l'amélioration évidente des transferts d'oxygène et de matière. Ce fermenteur semblerait donc pouvoir pallier aux problèmes inhérents aux microorganismes à structure filamenteuse, tels que nos champignons, au cours des procédés de fermentation.

Le rendement glucose ou hydrates de carbone totaux, est toujours supérieur à 50 % pour la souche *Aspergillus alliaceus*, approchant parfois 80%. Ces chiffres sont considérés comme tout à fait exploitables par les industriels. En ce qui concerne la souche *Cunninghamella echinulata*, le rendement est estimé entre 40 et 53% pour deux expériences seulement et peut donc être certainement largement amélioré. Sur les expérimentations menées, les paramètres suivis nous montrent une très bonne corrélation entre eux, et démontrent tous une croissance importante et reproductible. Les taux de croissance montrent une valeur multipliée par 2 par rapport aux cultures en erlenmeyers tandis que les rendement maximaux atteints ont été multipliés par 1/3 environ.

L'"Hubstrahlbioreaktor" nous semble donc avoir apporté une contribution importante à l'amélioration du procédé des fermentations fongiques.

IV.2 - EXTRACTION DE NOS SUBSTANCES DES SOUCHES FONGIQUES

Nous allons nous intéresser d'abord au problème de l'extraction de l'Ellipticine et de la 9-OH ellipticine de nos souches fongiques. En effet, même si ce problème n'est pas dans l'ordre chronologique du procédé, il nous paraît cependant nécessaire de connaître ce système duquel découleront les résultats de la bioconversion en elle-même. D'autre part, il nous semblait difficile de présenter des résultats de bioconversion d'après la technique d'extraction sans connaître auparavant l'efficacité de notre système extractif.

IV.2.1 - EXTRACTION PROBATOIRE SUR LES TÉMOINS

IV.2.1.1 - Calculs selon l'étude théorique

Avant de procéder aux calculs, il était nécessaire de connaître les solubilités respectives de l'Ellipticine et de la 9-OH ellipticine dans les différents milieux que nous avons utilisés. La bibliographie ne donne que peu de renseignements : la solubilité dans l'eau de l'Ellipticine serait de $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ [22].

Afin de calculer d'une part, notre coefficient de partage et, d'autre part, le rendement théorique de l'extraction, nous avons défini expérimentalement les solubilités de l'Ellipticine et de la 9-OH ellipticine dans l'eau, le solvant d'extraction et le méthanol. Le tableau IV.4 présente nos résultats.

COMPOSES	SOLUBILITES (en µg/ml) SELON LES SOLVANTS		
	Eau	Acétate d'éthyle/ n-butanol (9/1)	Méthanol
<i>ELLIPTICINE</i>	1	350	300
<i>9-OH ELLIPTICINE</i>	6,5	750	-

TABLEAU IV.4 : SOLUBILITES COMPAREES DE LA 9-OH ELLIPTICINE ET DE L'ELLIPTICINE.

a) Ellipticine

Le rapport de distribution ou coefficient de partage K , calculé pour notre solvant d'extraction acétate d'éthyle/n-butanol, selon l'équation (3) (chapitre II.4.2.1) devient ainsi:

$$K = \frac{S_S}{S_E} = \frac{350 \mu\text{g ml}^{-1}}{1 \mu\text{g ml}^{-1}} = 350$$

Le rendement R défini par $R = \frac{100.K}{K + \frac{V_E}{V_S}}$ montre que pour un volume de

solvant égal ou supérieur au volume de la phase aqueuse, on obtient toujours un rendement supérieur à 99,7% [157]. Si l'on diminue, en revanche, le volume de solvant par rapport à celui de la phase aqueuse, on constate que le rendement n'est que peu modifié. Pour un volume de 20 ml de solvant organique et un volume de 25 ml de phase aqueuse (volume de milieu standard de nos expérimentations), le rendement R est de 99,6%.

Il semble donc théoriquement possible d'extraire toute l'Ellipticine de la phase aqueuse.

De façon à connaître le nombre d'extractions théoriques nécessaires, nous avons calculé la quantité d'Ellipticine extraite en une seule fois selon nos conditions opératoires : 25 ml de milieu de culture, 200 µg d'Ellipticine mise dans cette solution aqueuse soit 8 µg.ml⁻¹, volumes des phases égaux.

D'après l'équation
$$C_n = C_o \cdot \left[\frac{1}{1 + K \cdot \frac{V_S}{V_E}} \right]^n$$

la quantité d'Ellipticine restant dans la phase aqueuse, à l'issue de la première extraction, est de $C_1 = 2,28.10^{-2} \mu\text{g.ml}^{-1}$. Cela représente 0,28 % de la quantité initiale, ce qui est donc négligeable.

Une seule extraction suffit en fait à extraire toute l'Ellipticine d'une solution aqueuse de 25 ml.

b) 9-hydroxy ellipticine

Le même calcul est à faire pour la 9-OH ellipticine. Les valeurs de solubilité trouvées semblent montrer que ce dérivé est plus soluble que l'Ellipticine.

Le coefficient de partage K est égal à 115,4.

Le rendement R, pour un volume de solvant égal au volume de la phase aqueuse, est de 99,1 %

La 9-OH ellipticine résiduelle dans la phase aqueuse après une extraction a une valeur de $C_1 = 6,88.10^{-2} \mu\text{g.ml}^{-1}$. Cela représente 0,86% de la quantité initiale de 9-OH ellipticine introduite dans la phase aqueuse, ce qui peut là aussi être considéré comme négligeable.

Ainsi, théoriquement, il est possible de récupérer facilement la quasi-totalité de nos substances au sein d'une phase aqueuse. Néanmoins, ces rendements théoriques paraissent difficilement applicables à un système d'extraction comportant un milieu de culture plus complexe qu'une simple phase aqueuse. On peut donc s'attendre à des difficultés et ne pas atteindre les valeurs idéales précédemment calculées.

IV.2.1.2 - Détermination des conditions optimales

Le Tableau IV.5 précise et définit les conditions opératoires que nous avons employées ainsi que les rendements des extractions effectuées sur les substances témoins introduites dans le milieu de culture. A partir de ce tableau, nous allons définir les conditions optimales de notre extraction.

* pH

Le rendement d'extraction est plus élevé dans un milieu basique. Du fait des deux atomes d'azote présents sur l'Ellipticine, la structure est partiellement électronégative ou nucléophile conférant à notre structure un caractère de base faible (les pKa ont été précisés au chapitre I) qui permet de l'extraire d'un milieu aqueux à pH basique. Ces résultats sont en accord avec la littérature donnant un pH basique de 8 à 9 comme pH optimal d'extraction. Nous avons pu récupérer plus de 80 % de l'Ellipticine et de son dérivé 9-hydroxylé à un pH de 8,5. On peut remarquer que la première série de dosage de la 9-OH ellipticine (A1 à A17) effectuée par colorimétrie donne des valeurs inférieures à celles trouvées par chromatographie liquide.

ESSAI N°	MILIEU DE CULTURE (25 ml)	MYCE- LIUM	ELLIPT. (200 µg)	9-OH ELLIPT. (200 µg)	pH ajusté	VOLUME SOLVANT (ml)	NBRE EXTRACT.	DUREE EXTRACT. (minutes)	BROYAGE MECANIQUE	CENTRI- FUGATION	RENDEMENT D'EXTRACTION Déterminé par Chromatographie (color) : déterminé par colorimétrie		REMARQUES
											ELLIPTICINE	9-OH ELLIPT.	
A1	+	-	+	+	5,5	25	5	60	-	-		26,7 (color.)	
A2	+	-	+	+	5,5	25	5	60	-	-		10,5 (color.)	
A3	+	-	+	+	5,5	25	5	60	-	-		26 (color.)	
A4	+	-	+	+	5,5	25	5	60	-	-		29 (color.)	
M1	+	-	+	+	6	100	3	5	-	-	74	70	
M2	+	-	+	+	7	100	3	5	-	-	70	63	
A5	+	-	+	+	7	25	5	60	-	-		57 (color.)	
A6	+	-	+	+	7	25	5	60	-	-		51 (color.)	
A7	+	-	+	+	7	25	5	60	-	-		44 (color.)	
A8	+	-	+	+	7	25	5	60	-	-		53 (color.)	
A9	+	-	+	+	8	25	5	60	-	-		57 (color.)	
M4	+	-	+	+	8	100	3	5	-	-	69	69	
M15	+	-	+	+	8,3	100	3	5	-	-	99	74	
A10	+	-	+	+	8,5	25	5	60	-	-		47 (color.)	
A13	+	-	+	+	8,5	25	5	60	+	-		48 (color.)	
A17	+	-	+	+	8,5	25	5	60	+	+		69 (color.)	
CC3	+	+	-	+	8,5	25	5	60	+	+		76 (color.); 73	
M5	+	-	+	+	8,5	100	3	5	-	-	84,5	87,5	
M9	+	-	400	0	8,5	100	3	5	-	-	67	0	
M10	+	-	300	100	8,5	100	3	5	-	-	84	43	
M11	+	-	100	300	8,5	100	3	5	-	-	83	60	
M12	+	-	0	400	8,5	100	3	5	-	-	0	63,5	
M13	+	-	+	+	8,5	80	2	2	ultra-sons	-	37	28	
M14	+	-	+	+	8,5	80	2	10	ultra-sons	-	74	73	
M19	+	-	+	+	8,5	80	2	3	+	-	98,5	90	
M23	+	-	+	+	8,4	80	1	2	-	-	91	85,5	fraction 1
"	+	-			"	160	1	2	-	-	3,4	1	fraction 2
"	+	-			"	240	1	2	-	-	1,2	0	fraction 3
M20	+	-	+	+	8,5	20	1	10	-	-	97,5	71,5	fraction 1
"	+	-				40	1	10	-	-	2,5	3,2	fraction 2
"	+	-				60	1	10	-	-	0	1,4	fraction 3
"	+	-				80	1	10	-	-	2	3,3	fraction 4
M22	+	-	+	+	8,5	60	1	2	-	-	82,5	69	fraction 1
"	+	-				120	1	2	-	-	1,7	0,8	fraction 2
"	+	-				180	1	2	-	-	1,4	0	fraction 3
M21	+	-	+	+	8,6	40	1	5	-	-	98	80	fraction 1
"	+	-				80	1	5	-	-	7,2	4	fraction 2
"	+	-				120	1	5	-	-	2	0	fraction 3
"	+	-				160	1	5	-	-	0	0	fraction 4

TABLEAU IV.5 : CONDITIONS OPERATOIRES ET RESULTATS ANALYTIQUES DES EXTRACTIONS REALISEES.

ESSAI N°	MILIEU DE CULTURE (25 ml)	MYCE- LIUM	ELLIPT. (200 µg)	9-OH ELLIPT. (200 µg)	pH ajusté	VOLUME SOLVANT (ml)	NBRE EXTRACT.	DUREE EXTRACT. (minutes)	BROYAGE MECANIQUE	CENTRI- FUGATION	RENDEMENT D'EXTRACTION Déterminé par Chromatographie (color) : déterminé par colorimétrie		REMARQUES
											ELLIPTICINE	9-OH ELLIPT.	
M24	+	-	0	0	8,5	100	3	5	-	-	0	0	
M25	+	-	0	0	8,5	80	2	5	-	-	0	0	
M26	+	-	+	+	8,5	20	1	1440	-	-	81,5	69	
M27	+	-	+	+	8,5	20	1	15	-	+	85	71,5	
M28	+	-	+	+	8,5	20	1	30	-	+	98	76	
M29	+	-	+	+	8,5	20	1	30	-	+	97	77,3	
M30	+	-	+	+	8,5	40	1	30	-	-	98	76	
M33	+	-	+	+	8,5	20	1	5	-	+	77	67,5	
M6	+	-	+	+	8,7	100	3	5	-	-	84	79	
A18	+	-	-	+	8,8	25	5	60	+	+		59 (color.)	
A19	+	-	+	+	8,8	25	5	60	+	+		59 (color.)	
CC1	+	+	-	+	8,8	25	5	60	-	-		94	
CC2	+	+	-	+	8,8	25	5	60	+	+		82 (color.); 98	
CC4	+	+	-	+	8,8	25	5	60	+	+		81,5 (color.); 97	
CC5	+	+	-	+	8,8	25	5	60	+	-		67 (color.); 60	
A11	+	-	+	+	9	25	5	60	-	-		53,5 (color.)	
A14	+	-	+	+	9	25	5	60	+	-		36 (color.)	
A15	+	-	-	+	9	25	5	60	+	-		47 (color.)	
A16	+	-	-	+	9	25	5	60	+	+		46 (color.)	
M3	+	-	+	+	9	100	3	5	-	-	70	65	
M7	+	-	+	+	9	100	3	5	-	-	72	49	
M8	+	-	+	+	9,2	100	3	5	-	-	87,5	62	
A12	+	-	+	+	10	25	3	5	-	-		33 (color.)	

TABLEAU IV.5 : CONDITIONS OPERATOIRES ET RESULTATS ANALYTIQUES DES EXTRACTIONS REALISEES.

Cette observation peut s'expliquer par le fait que le volume de solvant et le volume à traiter sont en proportions égales : le volume de solvant est probablement trop faible.

** Volume et nombre d'extractions*

Nous avons un système d'extraction extrême car le coefficient de partage est très élevé ($K > 100$). Comme nous l'espérons, une seule extraction est suffisante pour nos essais théoriques ($n = 1$) avec le même volume de solvant que le volume du milieu de culture ($V_S/V_E = 1$).

Les petits volumes ne sont pas faciles à décanter correctement et l'on perd une grande partie du solvant organique. De plus, un petit volume provoque une microémulsion stable. Pour éviter ce problème, on a doublé le rapport V_S/V_E . En fait, les paramètres sont interdépendants car la durée de l'extraction est liée au volume: un petit volume augmente la durée d'extraction et inversement. De même, le nombre d'extractions est aussi lié au volume: il est plus efficace de faire deux extractions avec un petit volume qu'une seule avec un volume double.

** Durée de l'extraction*

Pour cette étude, une microémulsion stable est recherchée, car elle augmente le temps de contact entre les phases donc l'efficacité de l'extraction. Si les deux phases sont séparées, il n'y a presque plus de transfert de masse. D'après nos essais, il faut que l'extraction dure 30 minutes pour obtenir de bons résultats. Cependant, par doublement du volume V_S/V_E , l'émulsion se casse après 2 minutes et l'on observe qu'une agitation mécanique prolonge la durée d'extraction et améliore les transferts entre les phases.

** Agitation*

Comme nous venons de le voir, il est possible de prolonger le transfert entre les phases par une homogénéisation. Une série d'expériences réalisées en utilisant différentes sortes d'agitation tel que l'homogénéisation mécanique, les Ultra-sons ou une agitation manuelle montre que les meilleurs résultats sont obtenus avec l'homogénéiseur-disperseur Ultra-Turax® pendant 2 minutes. On a pu remarquer également qu'une centrifugation après mélange, agitation et décantation de la suspension ainsi créée permet une séparation bien meilleure des phases et augmente les rendements d'extraction.

** Influence réciproque des composés témoins*

Il s'agissait pour ces essais de mettre en évidence une éventuelle interférence des substances l'une sur l'autre. Nous avons procédé à des essais où les rapports des quantités entre l'Ellipticine et la 9-OH ellipticine variaient dans une proportion de 1 à 4. Ceux-ci ont révélé l'indépendance des deux alcaloïdes. Nous n'avons pas mis en évidence d'influence significative de la quantité d'une substance sur l'extraction. On peut néanmoins observer que les variations décelées au niveau des rendements d'extraction peuvent être dues à une sensibilité de détection.

D'autre part, nous n'avons pas, non plus, décelé d'interférences du milieu de culture.

En conclusion, les valeurs des paramètres nécessaires à une extraction optimale concernant nos composés témoins sur un milieu de culture ne contenant pas de mycélium peuvent être fixées comme suit :

Nombre d'extraction théorique = 1

Durée de l'extraction = 30 minutes

Rapport des volumes $V_S/V_E = 2$ à 4

pH de l'extraction = 8,5

Agitation mécanique et centrifugation améliorant nettement les rendements d'extraction.

IV.2.2 - ESSAIS D'EXTRACTION SUR DES BIOCONVERSIONS

Le Tableau IV.6 donne les résultats trouvés sur quelques essais de bioconversions réalisées en erlenmeyers.

Bien que le nombre d'extractions théorique soit de 1, on constate que l'extraction est à répéter deux fois ($n = 2$) pour obtenir un rendement maximum car le mycélium, bien que broyé, retient encore dans ses structures cellulaires dilacérées une grande partie de la 9-OH ellipticine produite. En présence de mycélium, on voit apparaître très facilement une émulsion stable ce qui facilite les transferts. 30 minutes de durée d'extraction semble une durée minimale que nous avons doublée pour des conditions optimales. Les champignons freinent probablement la décantation du milieu aqueux. L'homogénéisation ainsi que la centrifugation apparaissent là encore nécessaires.

Il est intéressant de noter qu'un brevet déposé en 1981 et donnant un procédé pour l'extraction de bouillons de fermentation non filtrés a apporté quelques éléments de réflexion [159]. En effet, après quelques rappels de la notion importante de pH pour l'extraction, ils préconisent l'utilisation d'un pH acide pour l'extractions d'alcaloïdes peptidiques, ce qui n'est pas notre cas. Ils constatent, par ailleurs, que des substances organiques de haut poids moléculaire précipitent et sont capables d'adsorber une partie importante des alcaloïdes. Ainsi, si l'extraction est réalisée dans la gamme de pH basique et que les alcaloïdes sont précipités, la formation de ces précipités devient plus intense et à la fois la séparabilité et les rendements se détériorent. On remarque donc que le problème de l'extraction de substances est à la fois complexe et empirique.

Nous avons également testé la méthode d'extraction au Soxhlet : cette technique consiste à procéder à l'extraction en continu et à chaud d'un mélange de composés solides en suspension dans un liquide. Le volume de solvant organique nécessaire à l'extraction est 8 à 10 fois supérieur à celui du volume de l'échantillon à traiter. La température est la température d'ébullition du solvant organique, dans notre cas : 80°C. La durée de l'extraction, habituellement de 6 heures, a été prolongée jusqu'à 24 heures. Les résultats montrent une excellente extraction par ce système. Néanmoins, on peut s'interroger sur la dégradation possible qui affecte les produits extraits.

ESSAI N°	MILIEU DE CULTURE (25 ml)	MYCE- LIUM	ELLIPT. (200 µg)	9-OH ELLIPT. (200 µg)	pH ajusté	VOLUME SOLVANT (ml)	NBRE EXTRACT.	DUREE EXTRACT. (minutes)	BROYAGE MECANIQUE	CENTRI- FUGATION	RENDEMENT D'EXTRACTION Déterminé par Chromatographie		REMARQUES
											ELLIPTICINE	9-OH ELLIPT.	
M34	+	+	200	0	8,5	30	1	60	-	+	61,5	13,5	fraction 1
"	+	+				60	1	120	-	+	4	0	fraction 2
"	+	+				90	1	180	-	+	2,5	2,4	fraction 3
M35	+	+	200	0	8,5	30	1	60	+	+	40,5 *	22,3 *	fraction 1
"	+	+				60	1	120	+	+	20 *	7 *	fraction 2
"	+	+				90	1	180	+	+	3,5 *	1,5 *	fraction 3
M36	+	+	200	0	8,5	30	1	60	+	+	63 *	3,5 *	fraction 1
"	+	+				60	1	120	+	+	7,5 *	3,5 *	fraction 2
"	+	+				90	1	180	+	+	1,2 *	0,8 *	fraction 3
M37	+	+	200	0	8,5	30	1	60	-	+	63	4	fraction 1
"	+	+				60	1	120	-	+	5,5	0	fraction 2
"	+	+				90	1	180	-	+	2,7	0	fraction 3

N.B : Les résultats marqués d'une astérisque* précisent les extractions qui ont été faites à chaud (45°C).

TABLEAU IV.6 : EXTRACTIONS REALISEES SUR DES ESSAIS DE BIOCONVERSION.

IV.3 - BIOCONVERSION DE L'ELLIPTICINE

Avant d'aborder les résultats que nous avons obtenus selon la méthodologie que nous avons définie au chapitre II.3.3.2.2, nous avons voulu présenter l'ensemble des résultats comme une étude successive de quelques paramètres. Il ne nous a pas semblé, en effet, opportun de procéder à une comparaison brute des résultats tant au niveau des souches qu'au niveau des réacteurs ou des erlenmeyers, car le phénomène de bioconversion est un système extrêmement complexe, de maîtrise difficile, où s'imbriquent de nombreux éléments pouvant chacun faire l'objet d'une étude approfondie. Aussi, malgré la possibilité de présenter les résultats pour telle ou telle souche, en fermenteur ou en erlenmeyer, et dans telles conditions opératoires, il nous paraît donc beaucoup plus satisfaisant, bien que plus risqué et difficile, d'appréhender, lors d'une étude, chaque facteur pouvant intervenir dans ce système.

Si l'on cherche à schématiser notre système, on peut très grossièrement représenter plusieurs cases telles que celles mentionnées ci-dessous.

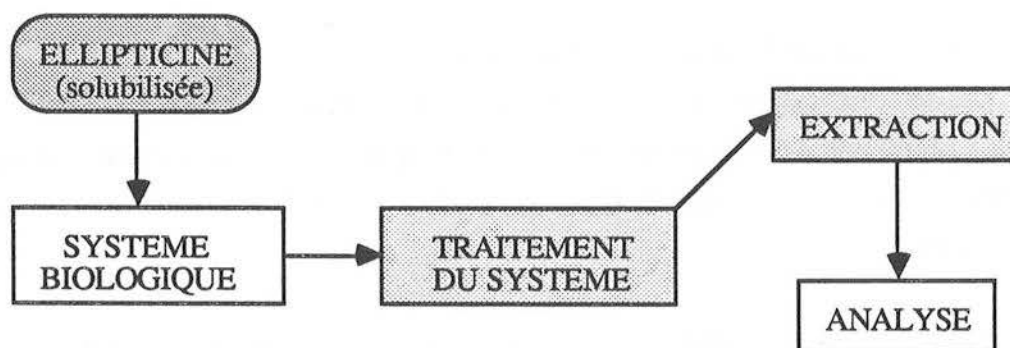


FIGURE IV.18 : SCHEMATISATION DU SYSTEME DE BIOCONVERSION.

Quels sont les éléments maîtrisables d'un tel procédé ?

D'abord, le système biologique en lui-même n'est pas maîtrisable si l'on ne tient pas compte de possibles manipulations génétiques. Ensuite, des éléments tels que la durée de la bioconversion, le pH et l'aération peuvent être contrôlés, du moins dans une structure proche de celle d'un fermenteur. Enfin, toutes les manipulations contribuant au traitement du système biologique puis lors de l'extraction sont tout à fait maîtrisables mais cependant limitées au contrôle de certains éléments. On ne peut contrôler lors de ces opérations l'aération ou l'échauffement ponctuel d'une structure.

Après avoir défini l'expression de nos résultats, nous verrons comment notre méthodologie semble meilleure que celle décrite dans la littérature ainsi que les différents paramètres

que nous avons pu définir pour une bioconversion optimale de l'Ellipticine. Puis nous nous attacherons à déterminer la précision des analyses avant d'étudier *in vivo* la possibilité d'une réduction des dérivés oxydés formés à partir de la 9-OH ellipticine. Enfin, nous verrons les problèmes qui subsistent et les hypothèses proposées quant à cette transformation fongique de l'Ellipticine.

IV.3.1 - EXPRESSION DES RÉSULTATS

L'expression des résultats est très importante puisque selon leurs formes, il sera ou non possible de comparer et d'interpréter les valeurs obtenues.

Pour prétendre interpréter nos résultats, nous avons décidé de donner plusieurs valeurs différentes qui, selon nous, donnent le maximum de renseignements sur les résultats obtenus. En effet, on calculera d'abord à partir des analyses un rendement global :

$$R (\%) = \frac{\text{Quantité de toutes les substances extraites et correspondant à des produits}}{\text{Ellipticine introduite initialement}} \times 100$$

Ensuite, on calculera l'Ellipticine retrouvée.

Ces deux indications seront précieuses car elles permettront de savoir si l'extraction a été bien faite, si l'Ellipticine a été convertie ou non, si l'Ellipticine a été ou non utilisée par la souche fongique, etc... Il faut rappeler que le rendement d'extraction déterminé expérimentalement est toujours supérieur à 80%.

Enfin, nous mentionnerons, sur la base des résultats acquis au chapitre III, les taux de production de 9-OH ellipticine ainsi que des dérivés oxydés de la 9-OH ellipticine. Ces taux seront exprimés en mg de 9-OH ellipticine produite par gramme de matière sèche. L'avantage de rapporter une production par gramme de champignon est son homogénéité et la facilité de comparaison quels que soient les systèmes. C'est ce que nous appellerons les **taux de transformation**.

Par définition, on parle de conversion lorsque la fraction des réactifs transformés l'est par un ou plusieurs passages sur un catalyseur. Alors que la notion de rendement est le rapport entre la quantité de produit final et celle théoriquement attendue. On ne peut parler ici de rendement chimique au sens strict, de même que les résultats obtenus ne le sont que pour un seul passage sur notre catalyseur qu'est le système fongique.

On rappelle aussi que, généralement, les transformations que nous avons effectuées selon notre méthodologie l'ont été pour un temps de contact Ellipticine-système fongique de 1 heure, déterminé à la suite des expériences menées et décrites ultérieurement. Sauf mention particulière, ces conditions ont été respectées.

Un dernier point nous paraît également important à soulever : tous nos résultats seront pris sur une aliquote représentée par un erlenmeyer de 125 ml contenant 25 ml de milieu. On travaillera systématiquement sur ce volume qui est pour nous le plus petit volume commun. Ainsi, n'aurons-nous pas le souci de problèmes de reproductibilité et d'homogénéité du matériel vivant. En effet, au sein d'un erlenmeyer, la configuration spatiale d'un champignon, sa croissance, les conditions de culture seront plus reproductibles. Ayant démontré la reproductibilité des poids secs en erlenmeyers, on peut considérer que l'homogénéité du matériel doublé d'un calcul par gramme de matière sèche fongique nous préservera d'un biais trop important.

IV.3.2 - BIOCONVERSION SELON LA LITTÉRATURE

Le système décrit dans la littérature et mentionné au chapitre II avait été expérimenté par Chien, Rosazza et Smith [94,105,124]. Les résultats obtenus par ces auteurs ont montré un rendement de 20% pour la 9-OH ellipticine et de 5% pour la 8-OH ellipticine. Ils ne précisent pas cependant les quantités de matière sèche fongique qui ont été nécessaires à la conversion de l'Ellipticine. Les auteurs, dont la méthodologie d'extraction et de purification reste longue et minutieuse, analysaient des aliquotes de 2 ml chaque jour, pendant une semaine. Quelle est exactement l'homogénéité de la suspension ? Peut-on parler de reproductibilité au sein d'une suspension biologique fongique lors de prises d'essais de quelques millilitres ?

Nous avons néanmoins refait cette manipulation mais en prenant comme aliquote un erlenmeyer entier et non pas 2 ml.

IV.3.2.1 - Résultats

Les Figures IV.19A et IV.19B traduisent les taux de transformation obtenus pour une bioconversion liée à la croissance du mycélium. La Figure IV.19A montre que les quantités des produits obtenus, exprimées en μg , sont assez faibles. On remarque, de plus, un manque de cohérence au niveau de deux valeurs qui peut être due soit à l'analyse (de faibles écarts sur de petites quantités peuvent produire de grosses erreurs après calculs) soit à une vitalité particulière du champignon ces jours là mais cela paraît difficilement explicable.

La Figure IV.19B mentionne les taux de transformation trouvés pour la 9-OH ellipticine ainsi que pour un produit inconnu, avec en plus la courbe de croissance établie lors de l'expérience. Les taux de conversion obtenus pour la 9-OH ellipticine sont de l'ordre de $0,1 \text{ mg.g}^{-1}$ de matière fongique sèche par excès si l'on excepte la valeur de $0,18 \text{ mg.g}^{-1}$ trouvée au 14^{ème} jour. Cela représente environ 3% de taux de transformation par rapport à la quantité d'Ellipticine introduite.

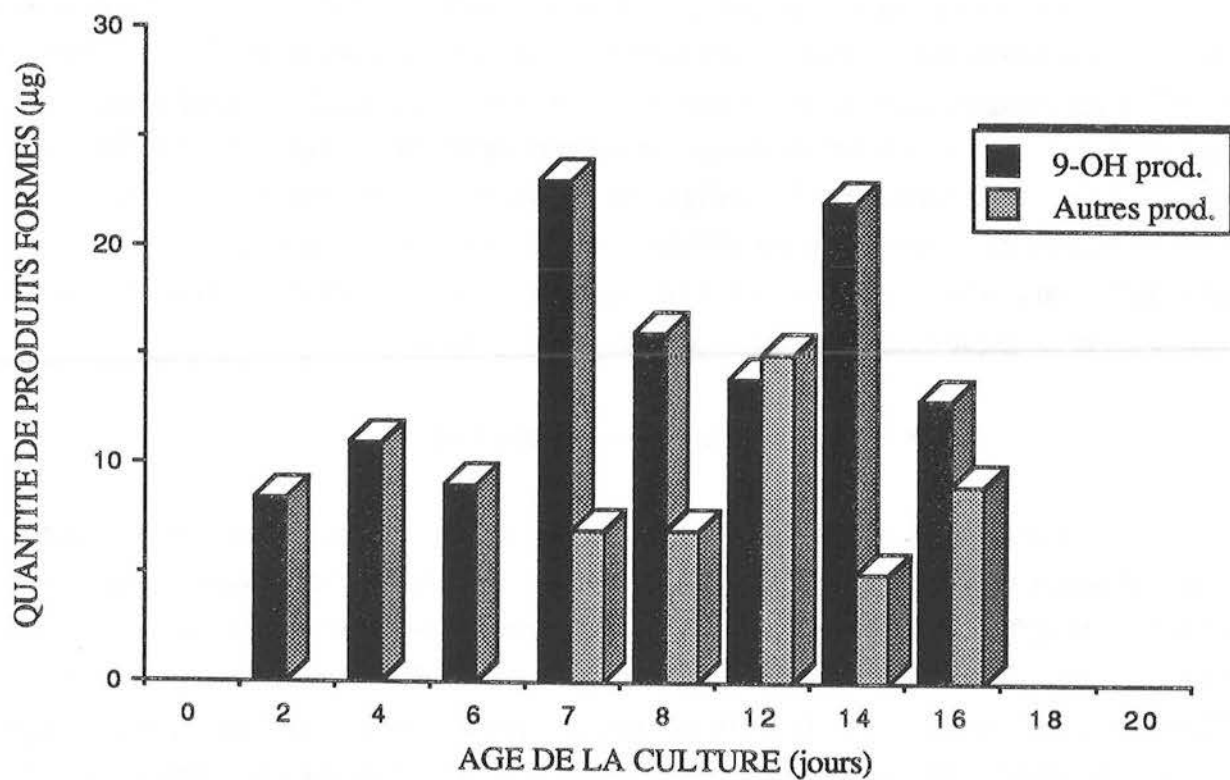


FIGURE IV.19A : BIOCONVERSION CLASSIQUE (Souche Aa).

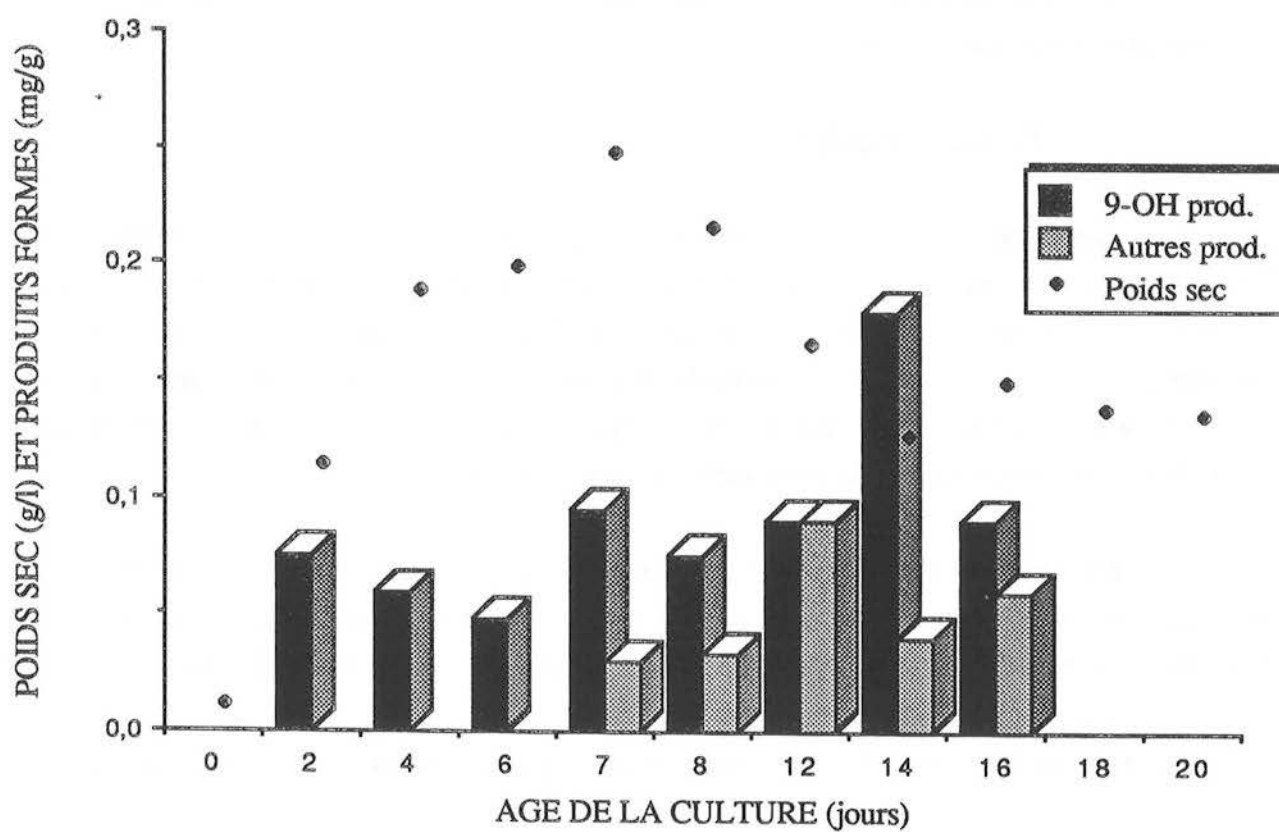


FIGURE IV.19B : BIOCONVERSION CLASSIQUE (Souche Aa).

Il faut noter que les analyses ont été effectuées sur un système chromatographique légèrement différent de celui qui a été précisé au chapitre III : il s'agissait d'une colonne Sphéripak de 6 μm de granulométrie, probablement plus résolutive que la colonne Microbondapak 10 μm , mais qui oxydait notre 9-OH ellipticine systématiquement. Après analyse ultérieure sur le système précisé, nous avons retrouvé des valeurs plus faibles qui peuvent s'expliquer par le temps écoulé entre la première analyse et son renouvellement.

Le produit que nous qualifions d'inconnu est présent en plus faible quantité et peut être éventuellement une forme oxydée de la 9-OH ellipticine que nous n'avons pu vérifier.

IV.3.2.2 - Discussion

Les résultats que nous avons obtenus ne montrent pas une grande efficacité de notre système. Le taux auquel nous arrivons est très faible et bien loin de ce que trouvent les auteurs précédemment cités ! On peut cependant à ce propos formuler plusieurs critiques :

- la technique des aliquotes nous semble peu reproductible. Bien qu'ayant déjà parlé de ce problème, on remarque que les auteurs ne se sont jamais avancés à donner un poids sec mycélien. Les aliquotes contiennent-elles du milieu, une culture importante, les deux ou bien une suspension microbienne parfaitement homogène ?

- Lors de l'étape d'extraction et d'analyse, les auteurs injectent directement un échantillon baignant dans l'acétate d'éthyle en chromatographie liquide [124]. Lorsque nous avons essayé de faire la même chose, nous avons observé une surévaluation systématique et prononcée de nos résultats. Les bilans globaux ne peuvent jamais être calculés tandis que les temps de rétention deviennent très difficiles à fixer. Toutes ces raisons ont motivé l'abandon d'une injection directe en C.L.H.P après extraction des souches fongiques par le solvant.

En fait, la technique utilisée par Chien & Rosazza est probablement très performante mais il est difficile de la reproduire. Le rendement faisant état de 0,56 g de 9-OH ellipticine produite lors d'une préparation en nombre d'erlenmeyers sur 3 g d'Ellipticine introduite laisse songeur. Combien d'erlenmeyers ont été utilisés ? Dans d'autres articles, ces mêmes auteurs parlent d'un rendement de 20 à 40% [83,98]. Que signifie-t-il si l'on ne connaît pas les ordres de grandeur des quantités d'Ellipticine introduites ? On suppose donc que quelle que soit la quantité d'Ellipticine, on aura conversion par le champignon ? Cela n'apparaît pas si évident.

Rapportée à un gramme de matière sèche fongique, quelle est donc la production réelle de leur système ?

On constate ici les limites des chiffres donnés et le manque de précision des informations mentionnées.

N'ayant donc pour toute comparaison que ces chiffres-là, nous nous sommes interrogés sur le choix de cette technique. La formation de pellets constatée sur nos multiples cultures en erlenmeyers apparaissait de façon évidente comme une entrave à une bioconversion optimale de l'Ellipticine par la limitation des transferts de matières : l'anaérobiose régnant dans la pelote n'était certainement pas la condition idéale.

A partir de cette constatation, nous avons examiné une autre méthode fondée sur le principe du cisaillement des champignons avant bioconversion et décrite sur la Figure II.12B. L'homogénéisation d'une culture mycélienne ainsi effectuée devrait améliorer sensiblement les taux de transformation obtenus.

Nous allons donc étudier maintenant les résultats émanant de cette méthode. Néanmoins, avant de poursuivre, nous aborderons un point incontournable de cette étude, même si nous en avons déjà parlé précédemment : le broyage des champignons à l'issue de la bioconversion et précédant l'extraction.

IV.3.3. - IMPORTANCE DU BROYAGE DES CHAMPIGNONS

Le broyage de nos microorganismes est une étape nécessaire dans la production du dérivé 9-hydroxylé. En effet, nous avons vu que la conversion de l'Ellipticine se fait au contact du système des monooxygénases à cytochrome P-450, donc de façon endocellulaire. Il fallait rompre les structures cellulaires de façon à pouvoir extraire les dérivés formés. Nous nous sommes fondés sur deux critères principaux parmi les cinq énoncés au chapitre II.4.1.1 pour déterminer la méthode de broyage la plus efficace. D'abord, la susceptibilité microbienne : il est, en effet, très difficile de casser des structures fongiques, et notamment lorsqu'il y a cloisonnement des hyphes comme dans la souche *Aspergillus alliaceus*. Il faut donc avoir des moyens énergiques de broyage. Ensuite, le taux de désintégration cellulaire doit être le plus élevé possible pour extraire facilement les produits formés des débris cellulaires. Ainsi, à partir de ces deux constats, nous avons essayé plusieurs moyens de dilacération cellulaire.

IV.3.3.1 - Méthodes non mécaniques

a) Congélation-décongélation

La méthode physique de congélation-décongélation est une méthode simple, universelle et préconisée quasi-systématiquement car elle permet une fragilisation des structures cellulaires, voire une lyse partielle effective. Cependant, les résultats obtenus sur des essais de transformation sont insignifiants.

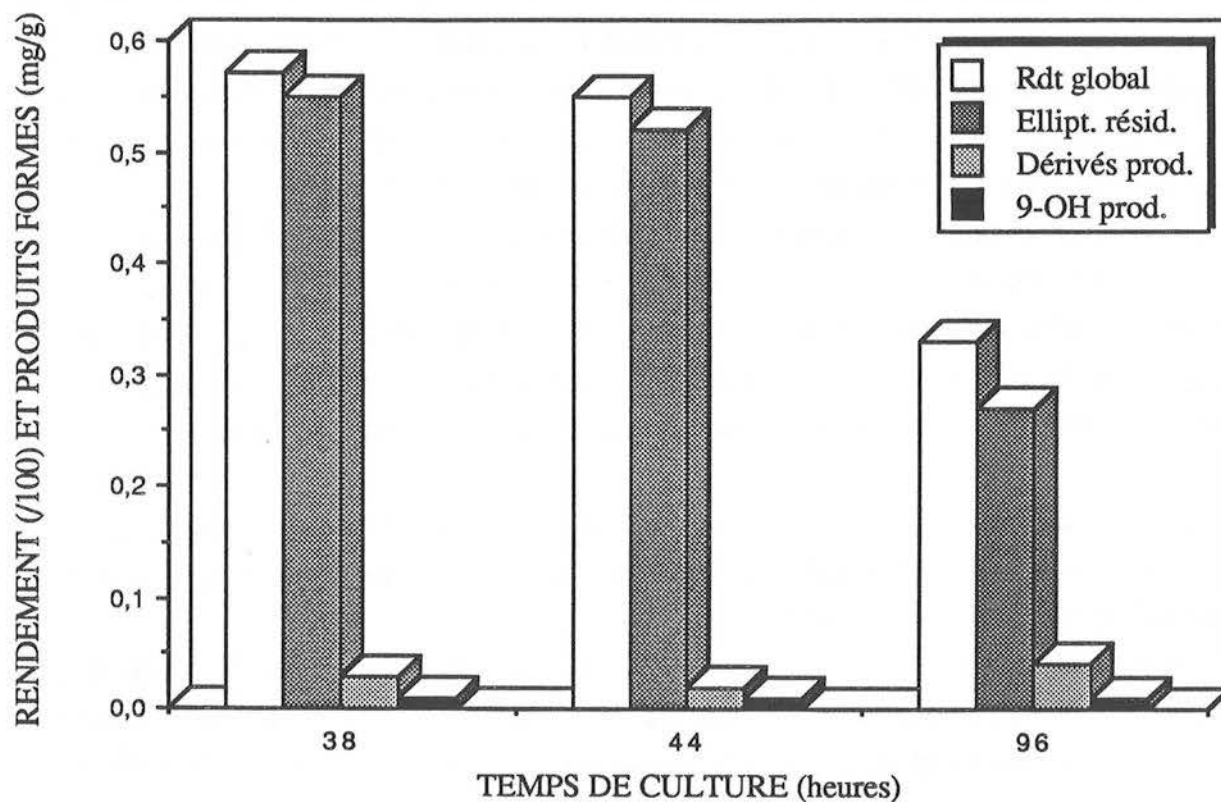


FIGURE IV.20 : BIOCONVERSION CLASSIQUE EN FERMENTEUR PULSE (Souche Aa).

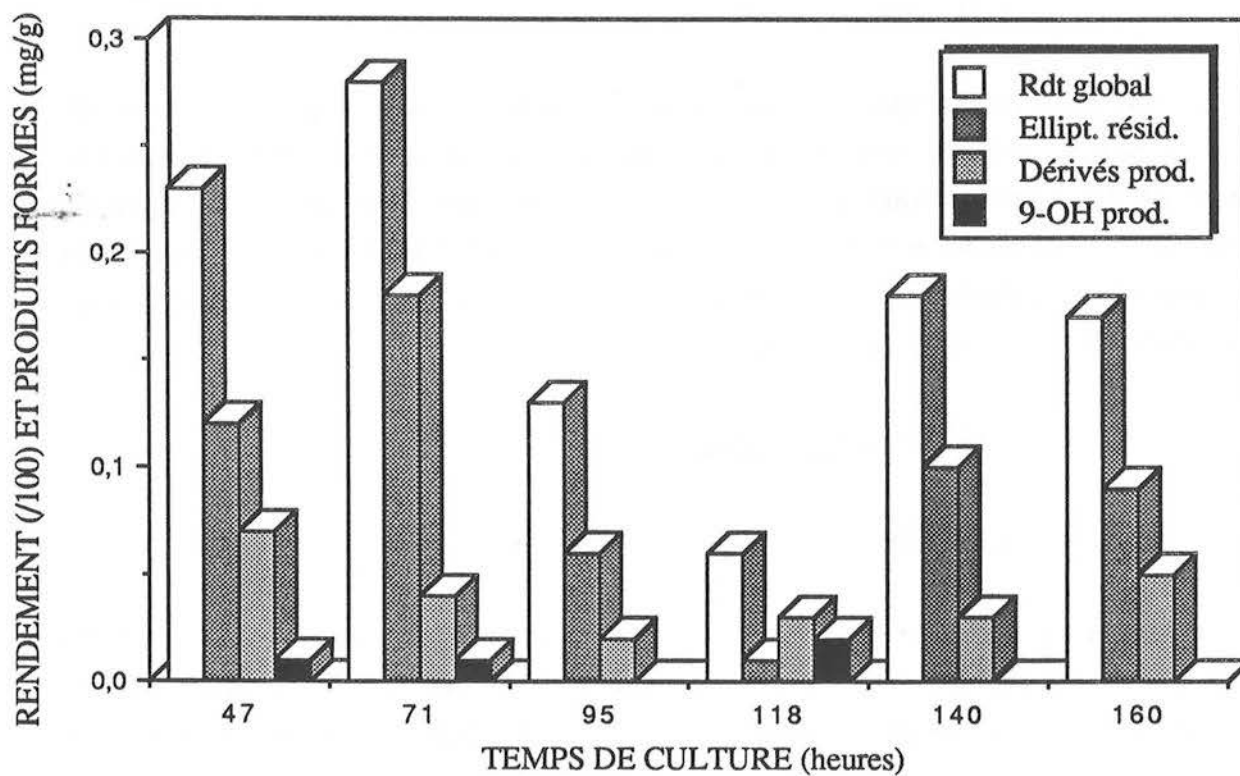


FIGURE IV.21 : BIOCONVERSION EN FERMENTEUR PULSE (Souche Ce, contact = 2 heures).

La Figure IV.20 présente une bioconversion réalisée en fermenteur pulsé avec la souche *Aspergillus alliaceus* et selon la méthodologie habituelle décrite dans la littérature, c'est-à-dire introduction de l'Ellipticine après 24 heures de culture et prises d'aliquotes au fur et à mesure de l'évolution de la conversion. La Figure IV.21 présente, quant à elle, la conversion de l'Ellipticine par la souche *Cunninghamella echinulata* en fermenteur pulsé et selon notre méthodologie.

Les résultats indiquent clairement que les valeurs trouvées sont bien inférieures à celles obtenues selon le système décrit dans la littérature (système classique). Les rendements globaux fournis montrent que l'on retrouve 50% de l'Ellipticine ainsi que de faibles quantités de produits. L'extraction par cette technique de congélation-décongélation ne semble pas efficace, et n'ayant pu disposer d'un autre système de broyage, nous nous sommes contentés de cette technique.

On observe donc des résultats extrêmement médiocres prouvant que cette méthode seule ne suffit pas. Néanmoins, nous pratiquerons systématiquement cette congélation qui ne peut qu'augmenter l'efficacité d'un broyage ultérieur.

On peut bien sûr poser d'autres hypothèses concernant l'échec de ces transformations, notamment pour la souche *Cunninghamella echinulata* (CBS 656.85). Est-elle réellement adaptée ? On peut supposer que l'assimilation de l'Ellipticine se fait puisque le pourcentage d'Ellipticine retrouvée est faible mais que devient-elle alors ? Il reste que si la méthode de dilacération cellulaire est responsable en grande partie de ce manque d'efficacité, il est probable qu'il y ait d'autres causes à ce phénomène sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement.

b) Méthode enzymatique

La méthode enzymatique avec utilisation de cellulase ou de lysosyme n'a pas montré d'amélioration réellement notable des taux de transformation obtenus (0,13 et 0,20 mg de 9-OH ellipticine et produits dérivés formés par gramme de matière sèche) et ne provoque qu'une fragilisation limitée des structures cellulaires. D'un coût non négligeable et étant susceptible d'interférer soit avec nos microorganismes, soit avec l'Ellipticine (ce qui n'a pas été vérifié), nous avons jugé préférable d'abandonner cette solution.

IV.3.3.2 - Méthodes mécaniques

a) Sonication

La méthode par Ultra-sons n'est pas apparue très intéressante car elle se révèle insuffisante par l'échauffement important de l'ensemble de la suspension biologique qu'elle provoque et qui est néfaste au système enzymatique comme aux produits susceptibles de se dégrader plus vite.

Ainsi			
Rendement global (%) =	64	55	64
Taux de transformation (mg.g ⁻¹)			
(9-OH ellipticine + Dérivés formés) =	0,10	0,07	0,05

On remarque que les taux de conversion et les rendements globaux sont faibles. Si l'on admet que la réaction a été complète, le produit transformé a probablement été détruit par la chaleur. Si l'on n'admet pas cela, c'est que l'extraction est incomplète et que des produits sont restés dans les structures cellulaires non éclatées. Nous n'avons donc pas retenu cette solution.

b) Cisaillement par homogénéiseur- disperseur

L'utilisation d'un disperseur-homogénéiseur améliore nettement la qualité de la culture fongique en vue d'une transformation de l'Ellipticine mais se révèle relativement inefficace pour un broyage optimal des structures fongiques avant leur extraction par des solvants organiques.

En effet, nous avons procédé à une expérience qui illustre bien ce phénomène : après avoir pris des cultures filtrées puis broyées à l'homogénéiseur-disperseur Ultra-turax®, nous avons pris séparément culot et surnageant de culture et avons procédé à une transformation. Les résultats montrent, sur la Figure IV.22, que le cisaillement du champignon avant bioconversion améliore les taux de conversion. En effet, on constate qu'environ 2/3 des produits transformés se retrouvent dans le surnageant et 1/3 dans le culot. Les bilans globaux montrent d'ailleurs que l'on peut certainement obtenir de meilleurs résultats sur le culot puisque l'on ne récupère que 65% des substances. L'expérience réalisée de façon concomitante le prouve puisqu'une culture broyée et filtrée où l'on ne récupère que le mycélium obtient des résultats tout à fait comparables (0,21 mg.g⁻¹ de matière sèche de produits formés). Si l'on tient compte du rendement d'extraction qui est de 80%, on constate qu'il manque 6% de substances et l'on peut estimer les capacités de bioconversion d'une telle souche à 0,46 mg par gramme de matière sèche. Le taux total obtenu de 0,43 mg par gramme de matière sèche est tout à fait remarquable.

Le cisaillement par un appareil homogénéiseur-disperseur permet de dilacérer environ 20 à 30% du mycélium dans des conditions que l'on peut qualifier d'assez douces. Ceci prouve le bien-fondé de notre méthodologie précisée au chapitre II par rapport à la méthodologie classique décrite dans la littérature puisque le système enzymatique se trouve en grande partie relargué dans le milieu de culture ou la solution aqueuse baignant le mycélium.

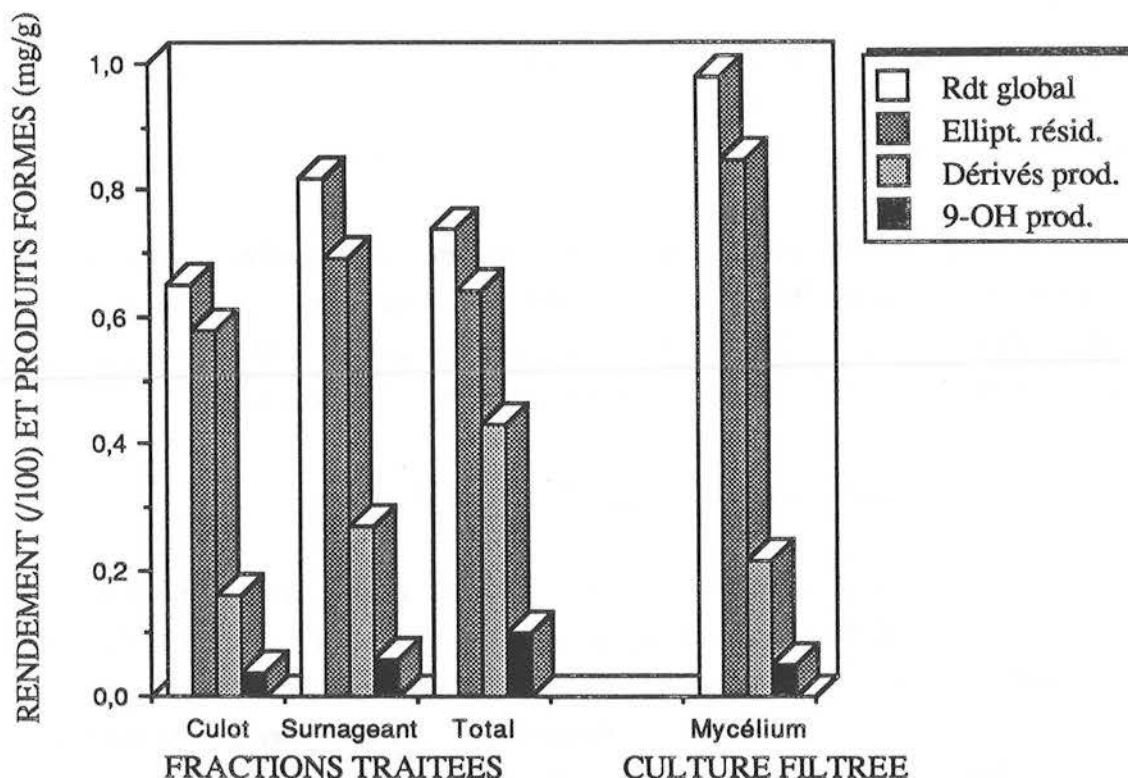


FIGURE IV.22 : TAUX DE CONVERSION OBTENUS SUR DIFFERENTES FRACTIONS DE CULTURES FONGIQUES (Souche Aa, cultures de 72 heures).

c) Trituration cellulaire

Après avoir constaté l'importance du cisaillement AVANT BIOCONVERSION, nous allons examiner l'effet d'un broyage par trituration APRES bioconversion. Nous conserverons toujours l'opération de cisaillement avant bioconversion.

L'Ellipticine est convertie dans le mycélium et nous avons montré qu'il restait des produits dans le magma mycélien. Le traitement drastique de cette biomasse s'impose donc.

Deux systèmes ont été testés : le tube de Dounce et le broyeur à billes Retsch®. De nombreux exemples nous ont démontré l'efficacité de la trituration. Le Tableau IV.7 nous présente quelques exemples comparés entre le Tube de Dounce, le broyeur à billes et un broyage mécanique intensif à l'homogénéiseur-disperseur.

	BROYAGE PAR TUBE DE DOUNCE			BROYAGE MECANIQUE	BROYAGE A BILLES
Rendement global (%)	58	69	74	89	94
Ellipticine résiduelle (%)	47	44	64	77	78
Dérivés formés (mg/g)	0,12	0,30	0,43	0,31	0,47
dont 9-OH produite	0,03	0,04	0,10	0,19	0,17

TABLEAU IV.7 : RESULTATS PARTIELS SELON LA METHODE PAR TRITURATION.

On constate que la méthode par trituration est la seule technique réellement et systématiquement efficace dans le traitement de la biomasse avant extraction. Les figures IV.23 et IV.24 présentent des photographies montrant clairement l'aspect d'un mycélium soumis à trituration au moyen d'un broyeur à billes pendant 8 minutes. Environ 90% du mycélium est dilacéré comme le présente ces clichés. Outre l'efficacité démontrée d'un tel traitement, il est à noter que maintenant on dispose de tels broyeurs à billes disponibles pour l'industrie, de taille suffisante pour accéder à un stade "préparatif".

Le Tableau IV.7 montre également l'efficacité du Tube de Dounce mais à un moindre degré ainsi que la possible utilisation de l'homogénéiseur-disperseur. Seulement pour utiliser ce dernier moyen qui n'est pas toujours reproductible, il faudra disposer d'une suspension microbienne relativement homogène. On remarque, en outre, l'importance des dérivés formés à partir de la 9-OH ellipticine dans tous les cas.

En conclusion, il paraît évident que le broyeur à billes est la meilleure solution pour l'extraction quasi-optimale des produits formés.

d) Autres moyens

Nous avons enfin testé le broyage au sable au sein d'un mortier. Les résultats peuvent paraître assez corrects puisque l'on obtient des taux de transformation variant de 0,10 à 0,20 mg.g⁻¹ de matière sèche.

Cependant, nous perdons énormément de substances au cours de ces opérations manuelles : les rendements globaux ne dépassent jamais 40%. De plus, une telle méthode est difficilement industrialisable.

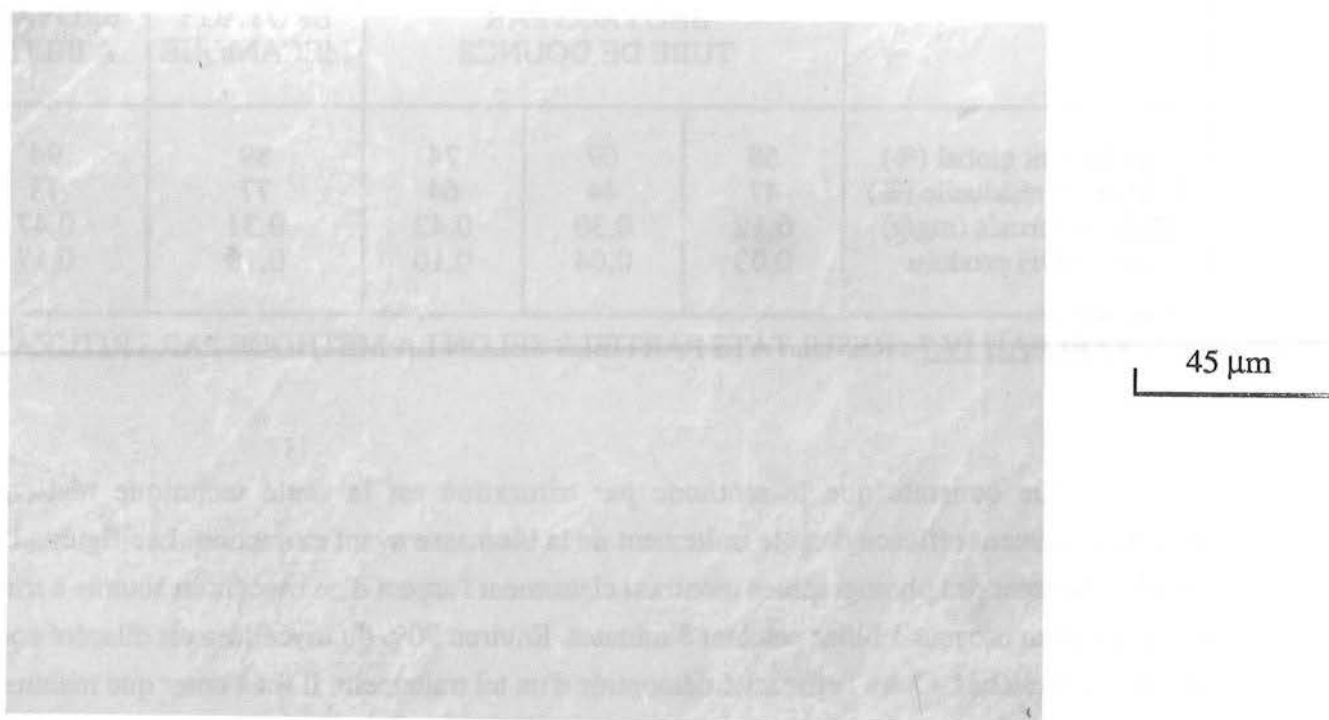


FIGURE IV.23 : ASPECT DU MYCELIUM EN MICROSCOPIE OPTIQUE
APRES TRAITEMENT AU BROYEUR A BILLES.

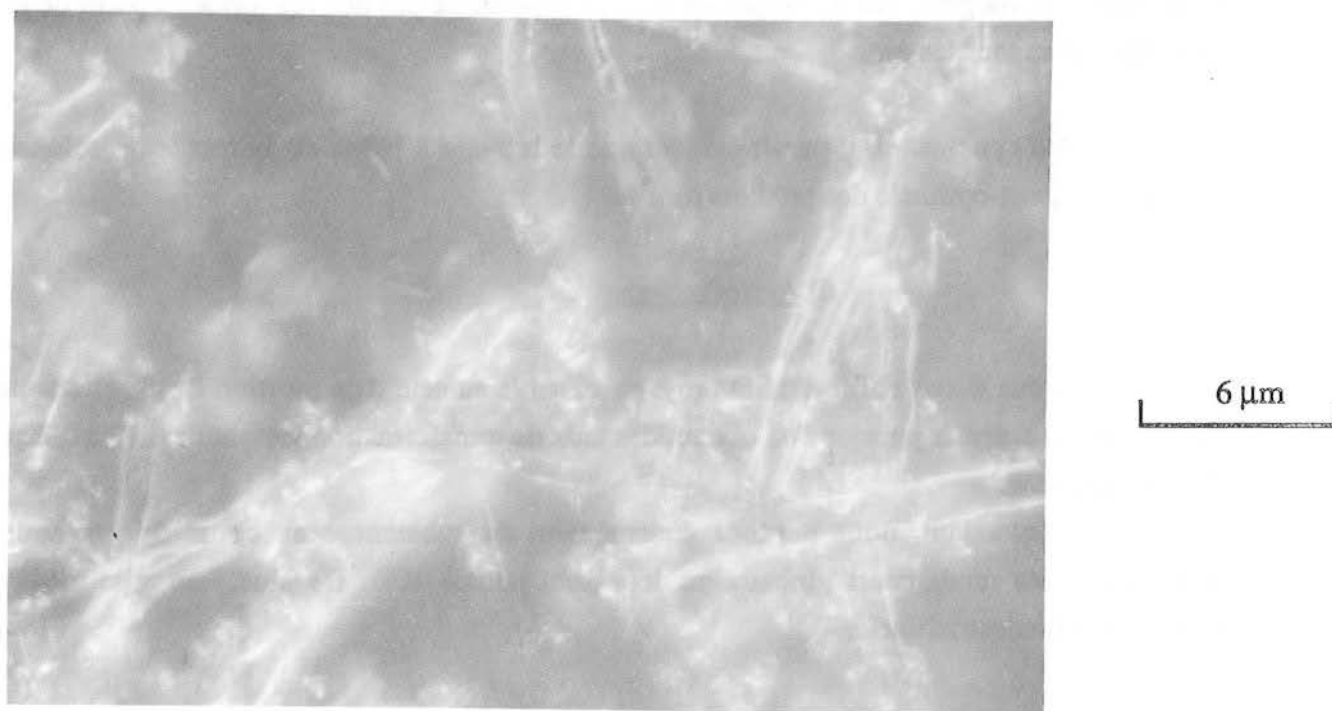


FIGURE IV.24 : ASPECT DU MYCELIUM EN MICROSCOPIE OPTIQUE (A L'IMMERSION)
APRES TRAITEMENT AU BROYEUR A BILLES.

IV.3.4. - METHODE D'EXTRACTION AU SOXHLET

Cette partie ne pouvait trouver place dans le chapitre du broyage et, d'autre part, nous ne pouvions préciser des résultats de bioconversion dans une autre partie.

Cette méthode a été appliquée soit à une culture ayant subi un broyage normal (cisaillement) avant bioconversion, soit à une culture issue d'un fermenteur pulsé. Nous rappellerons que l'aspect des suspensions microbiennes en fermenteur pulsé est très proche de l'aspect d'une culture traitée à l'homogénéiseur-disperseur.

Nous avons voulu voir si un broyage par trituration après la bioconversion était réellement nécessaire. Nous avons extrait des cultures provenant d'erlenmeyers au moyen d'ampoules à décanter classiques. Il existe des méthodes d'extraction en continu telle que celle du soxhlet, décrite au paragraphe IV.2.2. Nous avons voulu expérimenter cette méthode sur des cultures en fermenteur qui étaient beaucoup plus homogènes que celles obtenues en erlenmeyers.

Les résultats obtenus montrent que cette méthode pourrait être tout à fait utilisable puisque nous obtenons de très bonnes valeurs sur des essais effectués en fermenteur pulsé. Le Tableau IV.8 résume les différents essais.

TEMPS DE CONTACT : ELLIPT-CHAMP.	10 heures	24 heures	21 heures
RENDEMENT GLOBAL	75%		85%
ELLIPTICINE DETECTEE	59%		82%
9-OH ELL. FORMEE ET DETECTEE * PAR COLORIMETRIE * PAR C.L.H.P (exprimée en mg/g de mat.sèche)	0,49 0,42	0,54 -	0,55 0,16*

* Dosage au bout de plusieurs semaines (la 9-OH ellipticine s'est dégradée).

TABLEAU IV.8 : RESULTATS DES BIOCONVERSIONS EXTRAITES PAR LA METHODE DU SOXHLET.

On notera que les valeurs mentionnées dans ce tableau sont la moyenne de 4 valeurs minimum pour chaque technique et pour chaque système. Nous pouvons considérer ces résultats comme excellents. Les deux méthodes analytiques utilisées feront l'objet d'une discussion ultérieure.

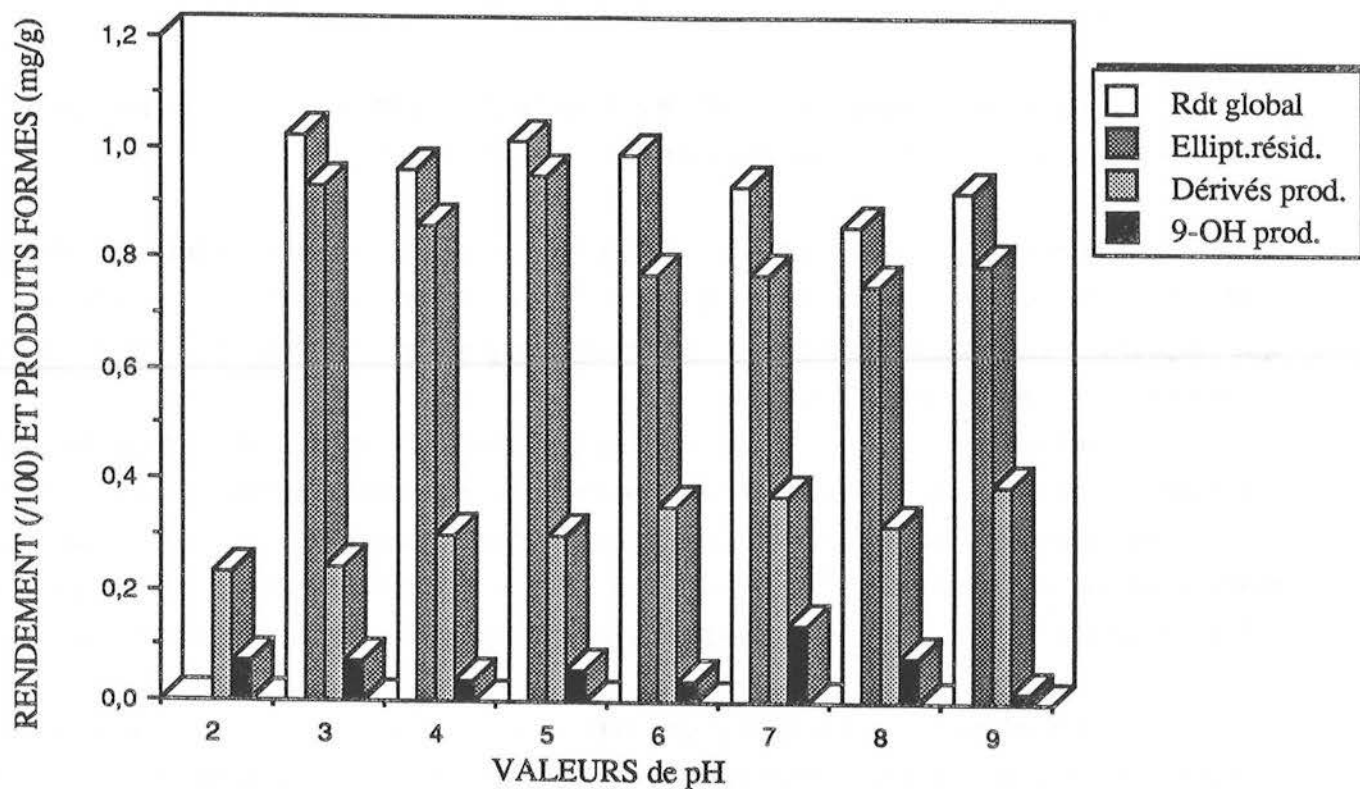


FIGURE IV.25 : INFLUENCE DU pH SUR LA BIOCONVERSION (Souche Aa, contact = 1 heure).

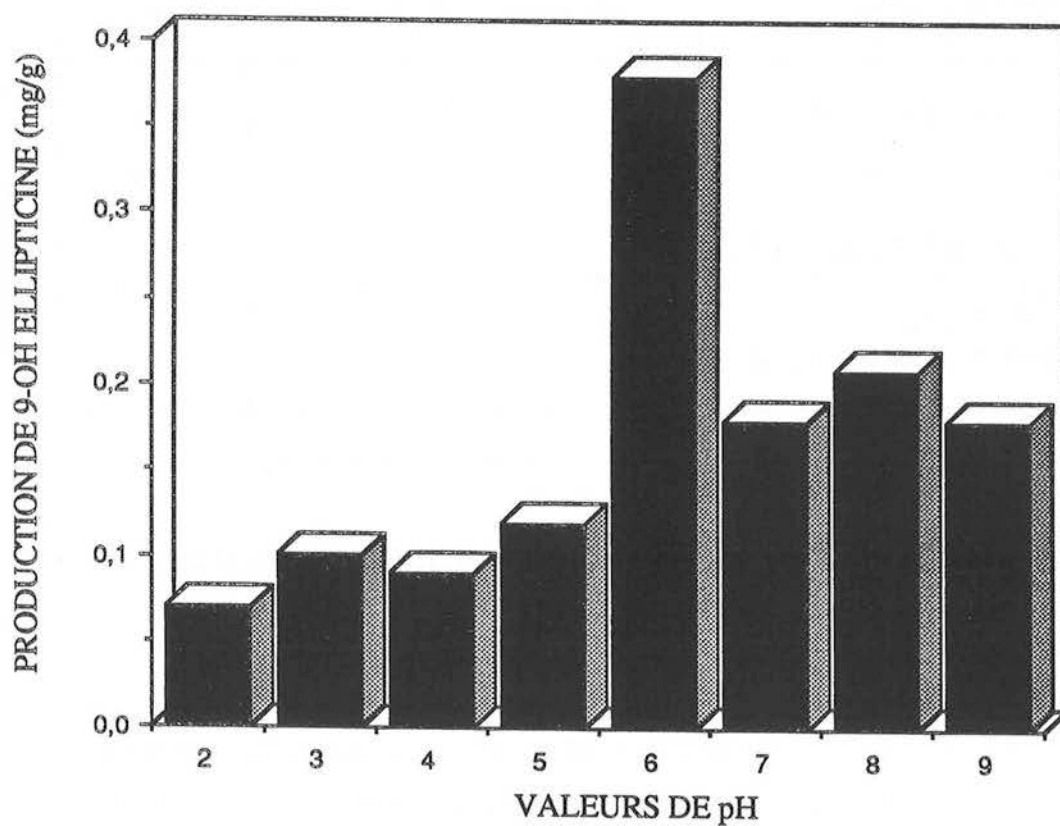


FIGURE IV.26 : INFLUENCE DU pH SUR LA BIOCONVERSION.
RESULTATS OBTENUS PAR ANALYSE COLORIMETRIQUE.

IV.3.5 - PARAMETRES LIÉS À LA BIOCONVERSION

Nous allons maintenant tenté de déterminer différents paramètres intervenant dans la bioconversion et pouvant influencer sur cette dernière.

IV.3.5.1 - Valeur optimale du pH

L'étude de l'influence du pH que nous avons mené sur la souche *Aspergillus alliaceus* en culture en erlenmeyers nous a permis de constater qu'un pH compris entre 6,0 et 8,0 donnait les meilleurs résultats. La Figure IV.25 présente ces résultats obtenus par chromatographie liquide. Les mêmes résultats, concernant l'influence du pH, sont présentés sur la Figure IV.26 après analyse par colorimétrie. L'intérêt de présenter cette figure est motivé d'une part, par les problèmes de dégradation de la 9-OH ellipticine, et d'autre part, par une comparaison des résultats analytiques sur lesquels nous reviendrons plus tard.

Les résultats décrivent relativement bien plusieurs éléments.

- Les bilans globaux calculés sont très bons, cohérents si l'on excepte les quelques rendements qui sont très légèrement supérieurs à 100 et qui sont le fait d'erreurs minimales affectant les analyses. Seul le premier bilan, évalué pour le pH de 2, paraît tout à fait aberrant (150%).
- La transformation semble meilleure en milieu neutre ou faiblement basique même si l'on constate une dégradation accrue de la 9-OH ellipticine. En revanche, un milieu acide minore la transformation mais préserve mieux une dégradation du dérivé 9-hydroxylé. Le rapport 9-OH ellipticine sur Dérivés formés est plus important à pH acide, les produits phénoliques se dégradant beaucoup moins en milieu acide.

D'autres analyses ponctuelles nous ont également démontré une meilleure conversion dans une gamme de pH se situant entre 6,0 et 8,0. On remarque que le pH des cultures fongiques, acide au départ, s'oriente naturellement vers ces valeurs.

IV.3.5.2 - Quantité d'Ellipticine introduite

La quantité d'Ellipticine introduite semble jouer un rôle puisque nous avons pu constater qu'en dessous de 100 μg d'Ellipticine incorporée dans un erlenmeyer (25 ml de milieu), on n'obtenait que très peu de 9-OH ellipticine. Après observation et analyse des premiers résultats, nous avons généralement mis en solution de l'Ellipticine à raison de 10 à 40 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de suspension fongique. Cela représente entre 1 et 4 mg d'Ellipticine par gramme de poids sec si l'on considère une biomasse moyenne atteinte de 10 $\text{g}.\text{l}^{-1}$. Des valeurs plus élevées n'ont pas donné de meilleurs résultats. On peut supposer qu'il existe un seuil limite inférieur d'Ellipticine à mettre dans le milieu, mais on ne doit pas oublier non plus que l'Ellipticine est le propre inhibiteur de sa transformation.

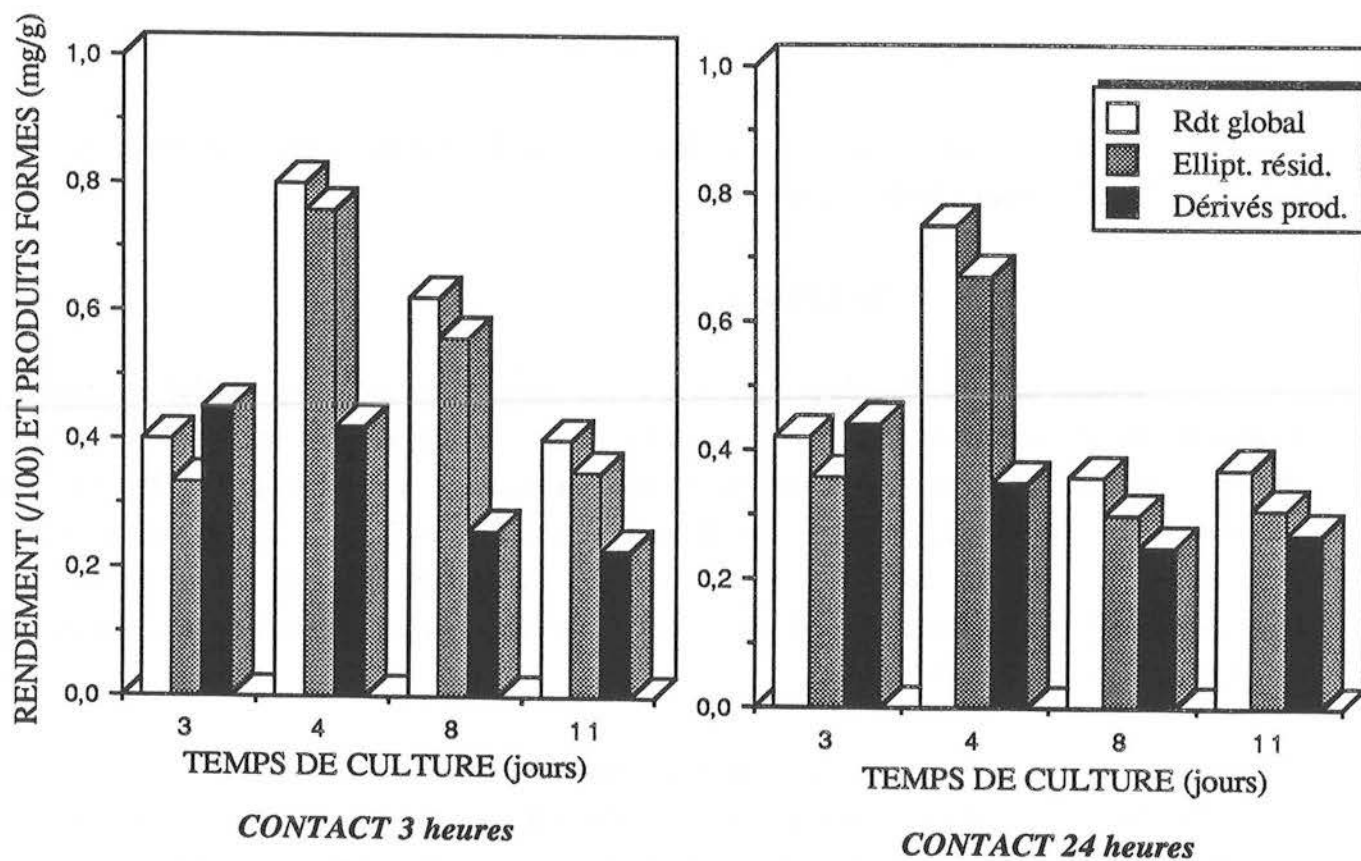


FIGURE IV.27 : BIOCONVERSION EN FONCTION DE LA CROISSANCE FONGIQUE POUR DES TEMPS DE CONTACT DE 3 OU 24 HEURES (Souche Aa).

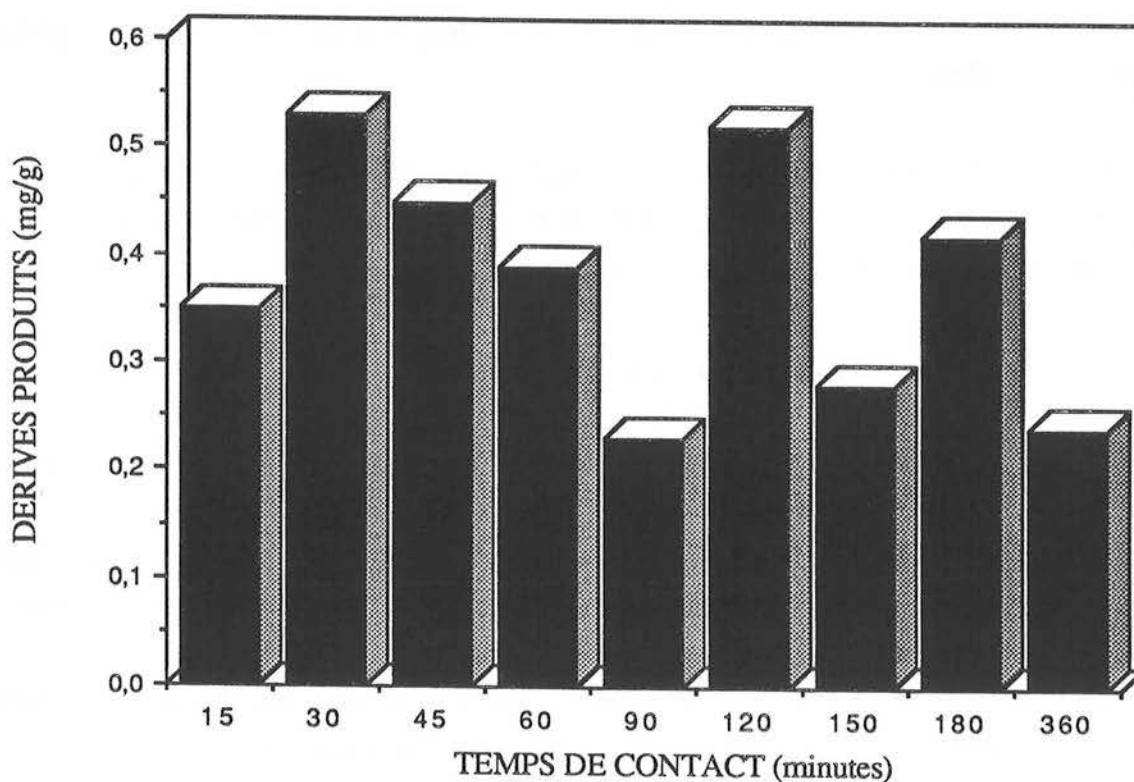


FIGURE IV.28 : CINÉTIQUE DE BIOCONVERSION (Souche Aa, 72 heures de culture).

On peut aussi mentionner un seuil limite de dosage de nos produits formés.

IV.3.5.3 - Cinétique de la transformation

Les cinétiques enzymatiques constituent généralement le point central d'un phénomène de conversion et nous avons voulu vérifier dans quelle mesure l'oxydation de l'Ellipticine, *via* le système des monooxygénases à cytochrome P-450, était rapide ou non. Au cours de cette étude, nous avons été soumis à plusieurs contraintes, dont notamment l'extraction, qui ne nous ont pas permis de procéder à un suivi en continu de la production de 9-OH ellipticine.

Les résultats mentionnés sur les Figures IV.27 et IV.28 ont été obtenus après analyse par un système chromatographique différent de celui décrit dans le chapitre II. Il s'agissait en effet d'une colonne Sphéripak® de 6 µm de granulométrie et moins adaptée que la colonne Microbondapak® de 10 µm de granulométrie à l'analyse des alcaloïdes indoliques tels que nos substances. Les résultats retraités ultérieurement sur notre système sont strictement identiques à ceux initialement trouvés si l'on considère l'ensemble des pics dérivant de la 9-OH ellipticine.

La Figure IV.27 montre que :

- la bioconversion est réalisée en quelques heures et semble meilleure pendant la phase exponentielle de croissance ou juste à la fin de celle-ci;
- nous n'avons pas noté de différences notables entre un temps de contact de 3 heures ou de 24 heures;
- on constate que l'Ellipticine a bien été consommée : 40 à 50% de l'Ellipticine introduite est récupérée.

La Figure IV.28 confirme la rapidité de la bioconversion. Celle-ci est réalisée pratiquement en 30 minutes sachant qu'il est matériellement impossible d'effectuer les différentes opérations de congélation, broyage, extraction, en moins d'un quart d'heure.

La production de 9-OH ellipticine se situe entre 0,25 et 0,50 mg de produits formés par gramme de matière sèche. La moyenne est d'environ 0,40 mg.g⁻¹ de matière sèche, malgré un pic dont la cohérence n'est pas évidente. Les problèmes de reproductibilité constatés sur cette même Figure IV.28 peuvent être liés au matériel fongique peut-être différent d'un erlenmeyer à l'autre, aux conditions opératoires, aux analyses...

Il apparaît néanmoins que la cinétique de bioconversion est rapide, confortant là encore notre hypothèse qui a débouché sur notre méthodologie.

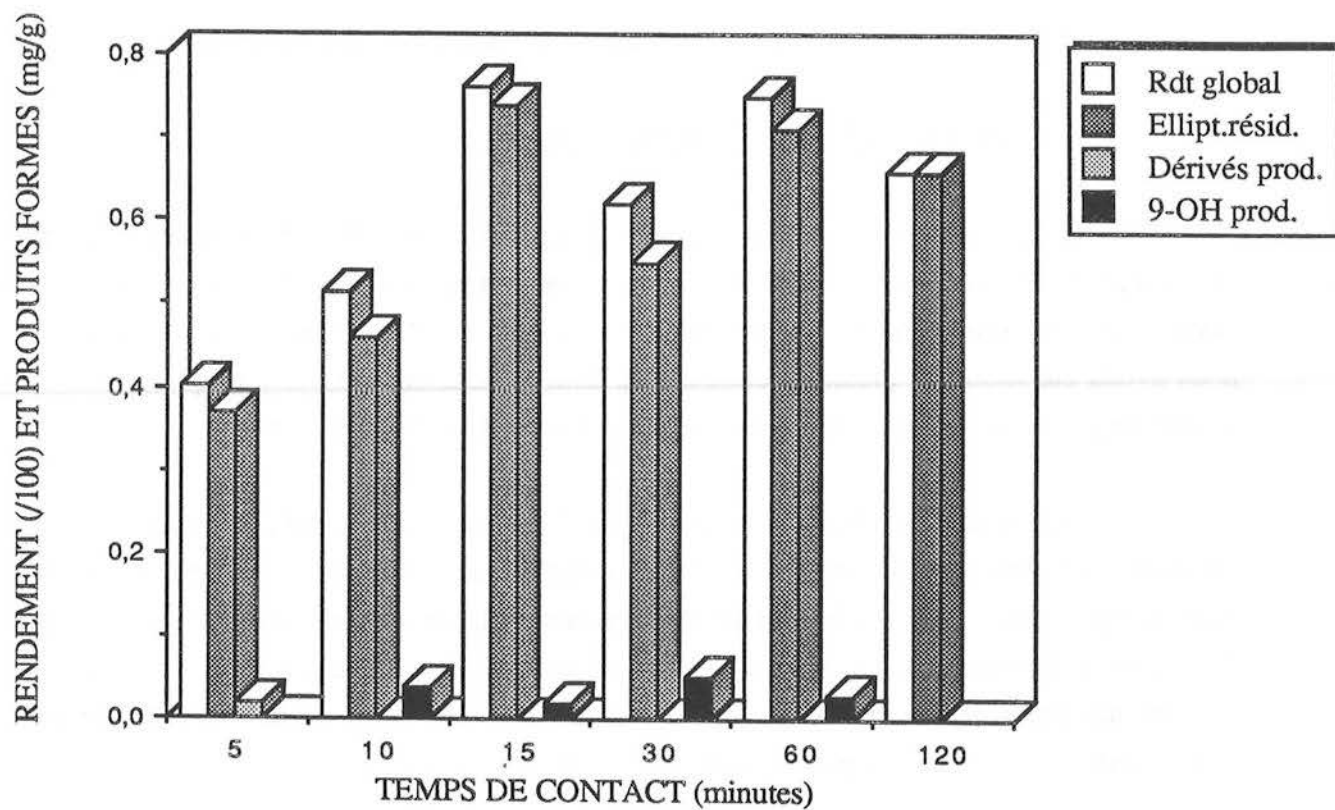


FIGURE IV.29 : CINETIQUE DE BIOCONVERSION A TEMPERATURE ELEVEE
(Souche Aa, Température > 28°C).

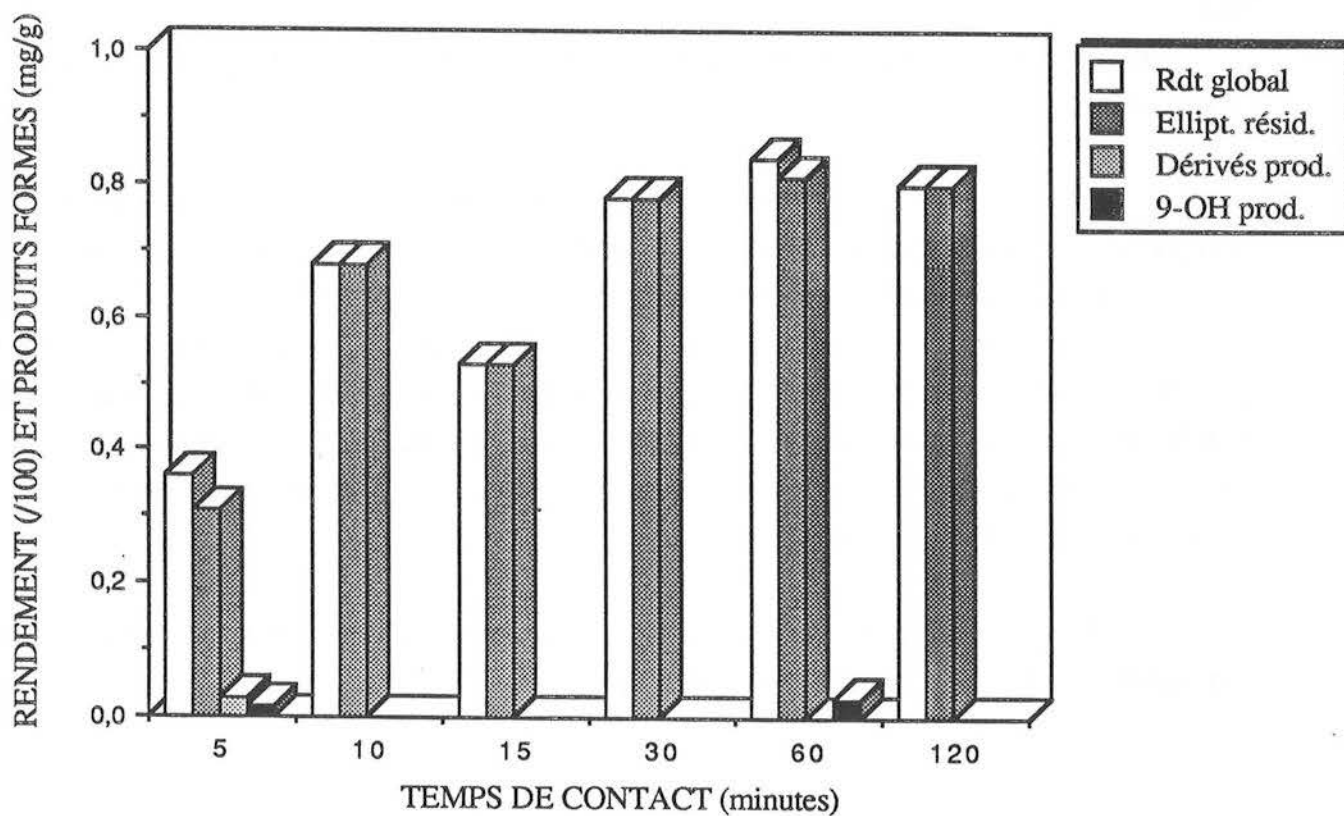


FIGURE IV.30 : CINETIQUE DE BIOCONVERSION A TEMPERATURE ELEVEE
(Souche Ce, Température > 28°C).

IV.3.5.4 - Paramètres externes : lumière, oxygène, température

L'étude précise et approfondie de ces paramètres n'a pas été possible. Cependant, nous pouvons donner quelques indications provenant de l'observation de nos expériences de bioconversion.

* *La lumière* : Nous n'avons pas décelé d'influence de la lumière sur l'efficacité des bioconversions. En effet, lorsque deux expériences identiques sont menées de front, l'une en chambre noire, l'autre à la lumière solaire, on ne constate pas, aux erreurs expérimentales près, de différences de production de 9-OH ellipticine. Il semble que ce facteur soit totalement étranger à une quelconque amélioration ou inhibition de la transformation de l'Ellipticine.

* *L'oxygène* : c'est un facteur nécessaire à deux processus. D'abord, il contribue à la croissance fongique. Ensuite, il s'intègre dans le cycle du métabolisme des champignons et notamment au niveau de la détoxification des xénobiotiques par le cytochrome P-450. Il a donc un rôle vital à jouer dans la transformation de l'Ellipticine. Mais c'est aussi, comme nous l'avons vu au chapitre III, un élément contribuant à la dégradation de la 9-OH ellipticine. Comment concilier ces deux rôles contradictoires ? Il est certain, en tous cas, qu'il a une grosse influence sur les résultats des bioconversions.

* *La température* : cet élément est également très important. Nous avons pu constater qu'une température supérieure à 28°C inhibait la conversion de façon notable. Il nous était parfois difficile de maintenir une température de 24°C l'été, et chaque fois, nous avons remarqué la faiblesse des résultats qui s'ensuivaient. Les Figures IV.29 et IV.30 montrent l'effet d'une température trop élevée sur les bioconversions réalisées selon notre méthodologie et sur les deux souches fongiques : *Aspergillus alliaceus* et *Cunninghamella echinulata*. On notera donc l'importance de travailler en chambres d'agitation thermo-régulées.

IV.3.5 5 - Discussion

Après avoir détaillé quelques paramètres pouvant influencer la bioconversion, il nous semble important de tenter de dégager les grandes lignes de cette transformation.

Nous avons pu déterminer que le pH optimal de bioconversion se situait dans une gamme de valeurs proche de la neutralité : le pH idéal est compris entre 6 et 8. On remarque un ralentissement de la formation de dérivés oxydés lors d'une bioconversion à pH acide tandis que cette dégradation est accrue à pH basique. Ceci confirme les observations que certains auteurs avaient déjà formulées [37].

La cinétique de bioconversion est rapide et l'on peut considérer une conversion effective de l'Ellipticine dès 30 minutes de contact entre l'alcaloïde et la souche fongique.

La température influe de façon directe et importante sur la conversion en l'inhibant dès qu'elle est supérieure à 28°C. Une des conditions fondamentales à respecter pendant la transformation sera donc une température constante de 24°C.

L'oxygène, élément non maîtrisé, est nécessaire à la bioconversion mais contribue également à la dégradation effective de la 9-OH ellipticine.

Enfin, il semblerait qu'une certaine quantité d'Ellipticine soit nécessaire à la réalisation de la bioconversion.

Les taux de transformation que nous avons obtenus nous semblent tout à fait intéressants pour un tel procédé. En effet, si l'on prend les meilleures valeurs que nous avons trouvées et si l'on tente d'établir un taux de conversion, on peut donner des indications précises quant à l'efficacité de cette bioconversion.

Ainsi, plusieurs fois, avons-nous détecté une quantité de 9-OH ellipticine de 0,7 mg.g⁻¹ de matière sèche. En supposant l'obtention d'une biomasse moyenne de 10g.l⁻¹ et l'introduction de 2 mg d'Ellipticine par gramme de matière sèche, nous obtenons un taux de conversion de 35%. Considérant le rendement d'extraction de 80%, nous récupérons 1 mg d'Ellipticine environ que l'on pourra repasser sur une nouvelle culture fongique. Cela signifie qu'au minimum 70% de l'Ellipticine est transformable par un système fongique.

On constate, maintenant, que nous sommes tout à fait dans la gamme des taux de conversion donnés par la littérature mais en indiquant clairement les quantités d'Ellipticine utilisées.

Ces résultats, obtenus selon différentes méthodes analytiques, sont donc encourageants. Néanmoins plusieurs remarques peuvent être formulées.

- Il semblerait que l'on constate un seuil limite de transformation de l'Ellipticine en 9-OH ellipticine. Existe-t-il donc une limite ? Ce phénomène rapide, affecté par de nombreux paramètres et dont la fragilité est certaine, est-il systématiquement optimal et fiable ?

- Les méthodes analytiques utilisées sont-elles reproductibles et comparables ?

- Le phénomène de dégradation de la 9-OH ellipticine nous a posé de très nombreux problèmes. Est-il possible d'envisager une réduction des dérivés oxydés formés, ou bien peut-on inhiber l'oxydation de ce dérivé 9-hydroxylé ?

Nous allons tenter d'apporter des éléments de réponse à ces questions en revenant brièvement sur chaque point. Nous verrons notamment les résultats des réducteurs testés *in vivo* sur nos essais de bioconversions.

IV.3.6 - PRÉCISION DES ANALYSES

Nous ne nous attarderons pas sur ce problème, mais il nous semblait important de s'assurer de la précision de nos analyses. Nous avons donc procédé à la détection U.V simultanée de nos produits, à deux longueurs d'onde différentes, après injection en C.L.H.P : 293 et 308 nm. Les raisons de notre choix ont déjà été expliquées auparavant.

Nous avons constaté une très bonne reproductibilité des résultats, quelle que soit la longueur d'onde choisie. On peut remarquer, cependant, que les analyses effectuées à 308 nm auraient tendance à majorer légèrement les résultats, et plus précisément ceux de la 9-OH ellipticine. Il faut, de même noter la reproductibilité presque parfaite des résultats obtenus pour l'Ellipticine à 293 nm ou 308 nm.

La méthode colorimétrique que nous avons mise au point était destinée à quantifier les composés oxydés formés par dégradation de la 9-OH ellipticine. Cette méthode appliquée au dosage de la 9-OH ellipticine a prouvé sa reproductibilité ainsi que sa fiabilité par rapport à la chromatographie en phase liquide, à 293 nm.

Si les analyses sont faites quasi-simultanément, les résultats sont très proches. En revanche, dans les cas où les analyses ont été faites à des intervalles de temps très grands, les résultats concordent très peu (cf Tableau IV.8).

Si l'on prend l'exemple de la Figure IV.26, révélateur selon nous des problèmes d'analyses auxquels nous nous sommes trouvés confrontés, on relève plusieurs observations. La colorimétrie donne un taux de 9-OH ellipticine beaucoup plus élevée que la C.L.H.P. On rappelle que la colorimétrie n'est susceptible de doser que la 9-OH ellipticine présente ainsi que la 9-oxo ellipticine éventuellement formée. Si l'on trouve des quantités inférieures en C.L.H.P, c'est que les colonnes de chromatographie en phase liquide oxydent notre composé. Ce phénomène est observé sur la Figure IV.25 où les "Dérivés produits" sont présents en grande quantité. Dans le cas de nos composés, on devra donc toujours avoir une suspicion quant au support chromatographique utilisé. Cette méthode devra toujours être couplée à une autre méthode de détection pour le dosage des produits formés.

IV.3.7 - ETUDE DE RÉDUCTEURS

L'étude réalisée au chapitre III.2.4 concernant une stabilisation de la 9-OH ellipticine *in vitro* par différents réducteurs avait montré une action efficace de la vitamine C. Nous avons donc réalisé des expériences où nous avons testé *in vivo* l'effet de la vitamine C sur la stabilisation de la 9-OH ellipticine produite par bioconversion.

La Figure IV.31 présente l'influence de la concentration de vitamine C sur la stabilisation de la 9-OH ellipticine produite. On observe que, quelle que soit la concentration de vitamine C, la production de 9-OH ellipticine n'est jamais augmentée.

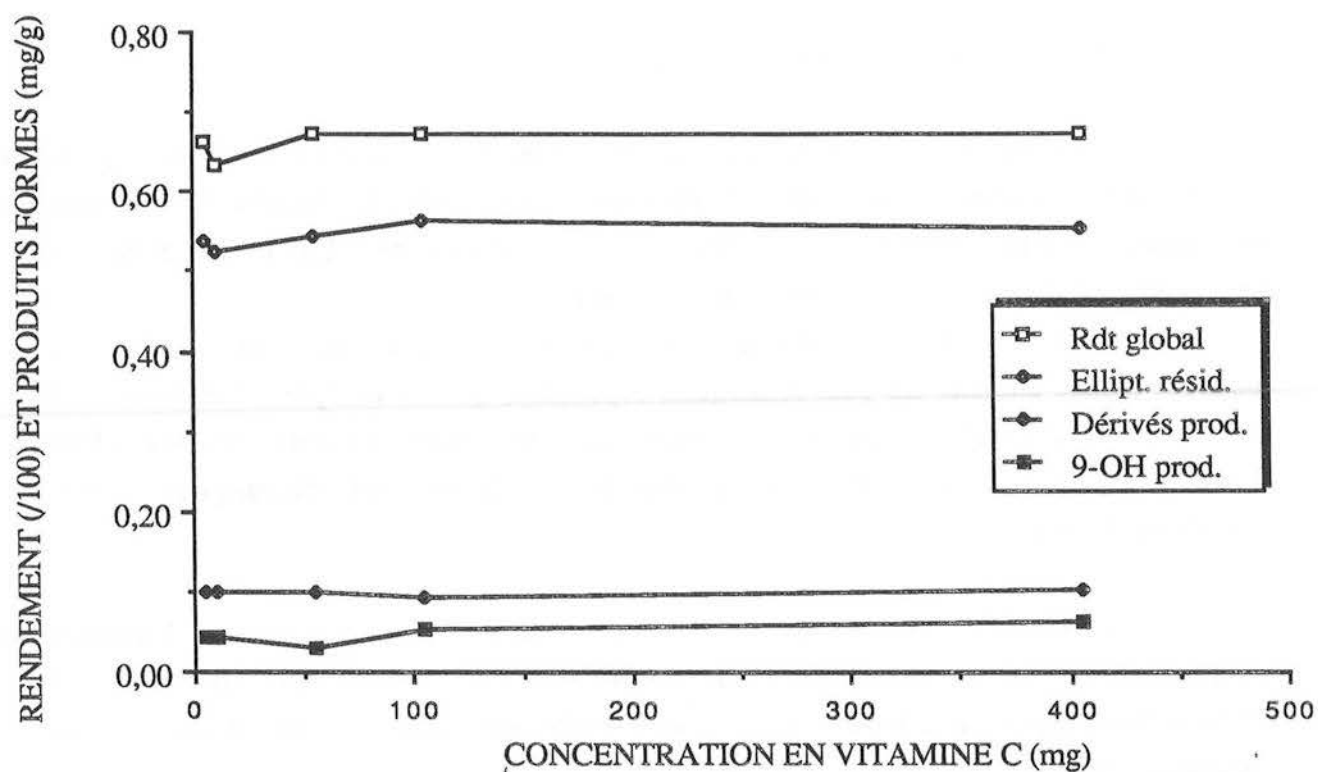


FIGURE IV.31 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN VITAMINE C (Souche Aa).

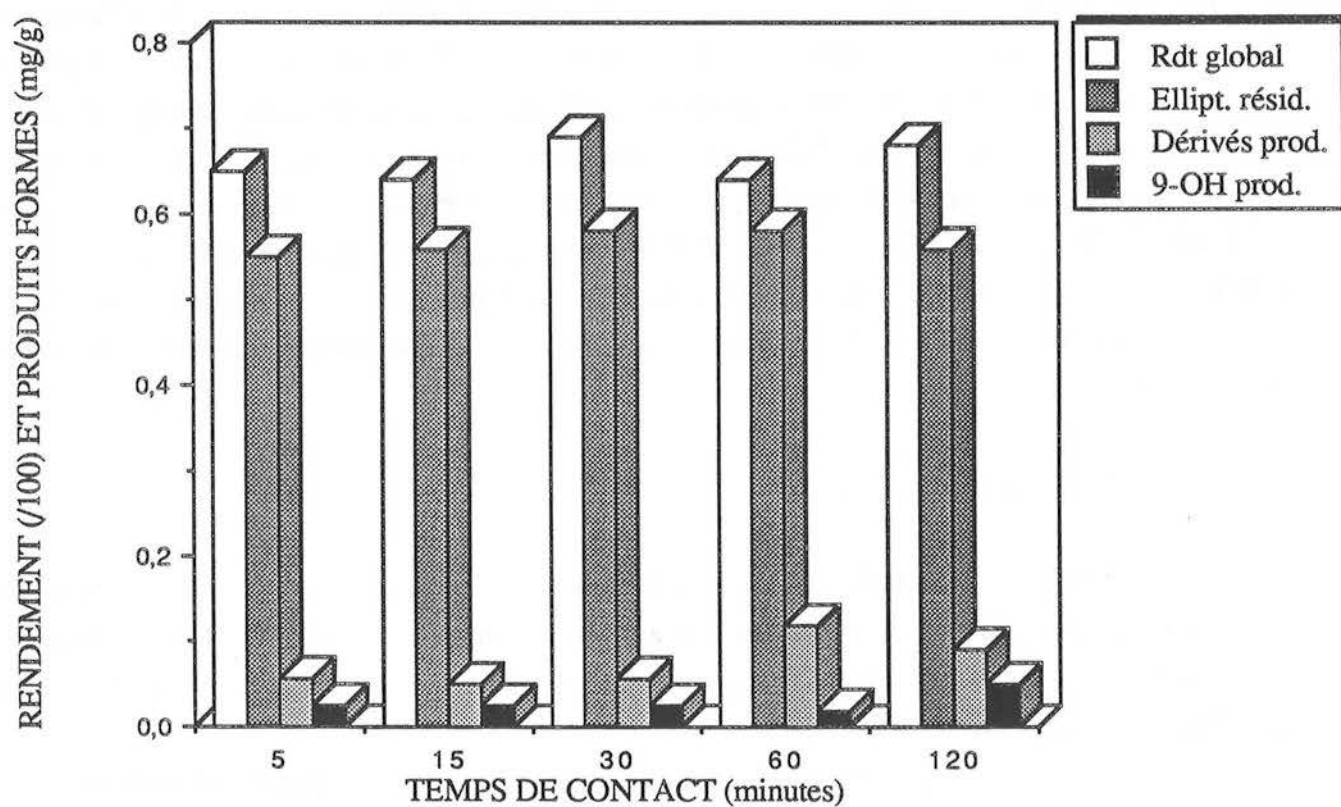


FIGURE IV.32 : CINETIQUE DE BIOCONVERSION AVEC REDUCTEUR (100 mg de Vitamine C).

On remarque, néanmoins, que les dérivés formés habituellement apparaissent en quantités relativement faibles. La Figure IV.32 montre que la vitamine C en quantité importante (100 mg) n'a aucune influence sur la cinétique de production de la 9-OH ellipticine.

Même si ces résultats montrent une certaine inhibition de la formation des dérivés oxydés, on constate l'inanité d'une telle solution pour la stabilisation de notre dérivé 9-hydroxylé.

Une autre expérience, utilisant l'E.D.T.A, qui est un agent complexant, a donné de bons résultats. En effet, pour des concentrations d'E.D.T.A de 0,2 M, nous obtenons 0,18 mg.de 9-OH ellipticine et 0,20 mg de dérivés oxydés par gramme de matière sèche.

Il semblerait donc que ce complexant soit beaucoup plus efficace *in vivo* que la vitamine C (alors qu'*in vitro*, nous ne l'avions pas démontré) pour stabiliser la 9-OH ellipticine dans son milieu de transformation.

Une explication du mécanisme d'action de l'E.D.T.A serait la facilité de création d'une liaison dative sur l'ion cétoiminium qui empêcherait ainsi la formation du produit stable oxydé qu'est la 9-oxo ellipticine. En agissant de la sorte, l'ion cétoiminium ferait revenir le composé intermédiaire oxydé de la 9-OH ellipticine à sa forme réduite.

IV.3.8 - CONCLUSION ET HYPOTHESES PROPOSÉES.

Comme le décrivait la littérature, la bioconversion de l'Ellipticine est possible via le système enzymatique des monooxygénases à cytochrome P-450 de certaines souches fongiques comme *Aspergillus alliaceus* et à un moindre degré, *Cunninghamella echinulata*. A l'issue de tous ces résultats, les conclusions que nous pouvons tirer de cette étude, valable principalement pour la souche *Aspergillus alliaceus* (CBS 536.65), peuvent se résumer comme suit :

* La bioconversion de l'Ellipticine est optimisée par l'utilisation d'un système de cisaillement du mycélium avant la bioconversion et par une trituration poussée de la biomasse lorsque la transformation de l'Ellipticine a été faite.

Cette constatation valide le choix que nous avons fait au départ. En effet, nous avons défini notre méthodologie à partir des observations faites lors d'expériences reproduites de la littérature. D'une part, l'homogénéisation de la suspension mycélienne par un agitateur mécanique devait augmenter les capacités de bioconversion du champignon par l'augmentation des surfaces d'échange ou par la libération du cytochrome P-450 dans le milieu ambiant. D'autre part, en limitant au strict minimum le temps de contact entre l'Ellipticine et le système fongique puisque l'Ellipticine, qui a une très forte affinité pour ce système des monooxygénases, est l'inhibiteur de sa propre transformation.

* Les essais effectués sur le réacteur "pulsé", dont l'aspect de la suspension microbienne se rapproche de celui obtenu sur une culture en erlenmeyer après homogénéisation, montrent que l'amélioration des transferts de matières par ce système profite aussi bien à la croissance fongique qu'à la bioconversion.

* Les conditions optimales de la bioconversion ont été précisées et montrent qu'un pH moyen de 7 ainsi qu'une heure de contact entre l'Ellipticine et le système enzymatique suffisent pour obtenir une production intéressante de 9-OH ellipticine à température ambiante de culture.

* Les valeurs de 9-OH ellipticine obtenues se situent en moyenne à 0.45 mg.g⁻¹ de matière fongique sèche pour des cultures en erlenmeyers et à 0.7 mg.g⁻¹ pour des cultures réalisées en fermenteur pulsé. Nous estimons qu'en disposant d'une biomasse fongique adéquate, il nous semble possible d'obtenir des taux de conversion proche de 70% pour une quantité minimale d'Ellipticine de 2 mg.g⁻¹ de matière sèche.

Ces conclusions paraissent séduisantes, mais il faut préciser que toutes nos expériences n'ont pas conduit systématiquement à un succès. Nous pouvons donc nous interroger sur les problèmes d'inefficacité de transformation parfois rencontrés qui affectent la maîtrise de cette conversion. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées en restant cependant extrêmement prudent quant à leurs validités.

D'un point de vue génétique, nous avons rappelé au début de ce travail la classification de nos souches. Les Deutéromycètes sont des champignons de forme imparfaite dont la multiplication sexuée n'a pas été démontrée. En fait, de plus en plus d'auteurs remettent en cause cette classification par l'existence de souches ayant à la fois une forme sexuée (Ascomycètes) et une forme non sexuée ou imparfaite (Deutéromycètes).

Or, au sein d'une culture, il est possible que l'on se trouve en présence des deux formes avec, en plus, deux autres possibilités : une forme homocaryotique et une forme hétérocaryotique. Ce point concernant le matériel génétique du champignon est important pour plusieurs raisons :

- dans le cas d'une structure sexuée, les conidies uninucléées de chaque pôle (positif et négatif) peuvent donner naissance à un mycélium hétérocaryotique. Mais elles peuvent aussi ne jamais se rencontrer et rester homocaryotique. Si l'on effectue des repiquages à partir de conidies uninucléées homocaryotiques, on sera sûr d'avoir cette forme mycélienne;

- dans le cas d'une structure non sexuée, le mycélium hétérocaryotique peut perdre un des deux pôles et revenir à une forme homocaryotique. On parle de parasexualité pour expliquer un retour à l'haploïdie à partir d'un mycélium hétérocaryotique.

Ces différentes combinaisons nucléaires offrent de multiples avantages aux champignons qui peuvent ainsi s'adapter dans de très nombreux environnements, parfois défavorables.

Il reste qu'une bioconversion nécessite la parfaite connaissance préalable du matériel vivant que l'on veut utiliser ainsi qu'une étude cytologique destinée à connaître l'état chromosomique d'une souche fongique.

Un autre point à soulever est celui de l'interconversion du cytochrome P-450. Il est, en effet, possible que sous l'action d'éléments contenus dans le milieu de culture ou de facteurs externes non maîtrisés, il se produise une interconversion du cytochrome P-450 qui deviendrait alors incapable de procéder à une oxydation de l'Ellipticine ou d'autres substances étrangères à l'organisme.

Nous n'avons pas étudié l'influence d'inducteurs du cytochrome P-450, connus et décrits dans la littérature, pour ces bioconversions mais on peut supposer qu'il doit exister des éléments capables d'induire le cytochrome P-450 au sein de notre système ou de l'inhiber complètement. Le NADPH, présent en quantité appréciable dans le mycélium, joue aussi un rôle, démontré dans la littérature [31].

Enfin, nous voulons évoquer plusieurs éléments, dont nous avons déjà parlé précédemment, mais qui s'imbriquent très probablement pour influencer ensemble et fortement sur le déroulement de la bioconversion : l'oxygène, l'Ellipticine et ses métabolites.

L'Ellipticine est capable d'induire le cytochrome P-450 mais aussi de l'inhiber. Il est donc possible qu'après l'arrivée massive d'Ellipticine, il y ait, après l'induction immédiate, une inhibition du système. Si, cependant, une faible quantité d'Ellipticine se fixe sur le système enzymatique, les capacités de bioconversion auront tendance à diminuer par inhibition du cytochrome P-450 avant la conversion d'un grand nombre de molécules d'Ellipticine. Ce serait, en fait, plutôt un défaut d'induction.

L'oxygène joue un rôle important dans le système de détoxification de l'organisme qu'est le cytochrome P-450. Ainsi, l'amélioration des transferts de matière et d'oxygène dans l'"Hubstrahlbioreaktor" est responsable de cette meilleure bioconversion alors qu'une conversion selon le système "classique" prouve ses limites. Cependant, l'oxygène favorise hautement la dégradation du métabolite recherché : la 9-OH ellipticine. Notre méthodologie, en augmentant fatalement le brassage de l'oxygène de l'air, montre là un certain handicap.

Les métabolites de l'Ellipticine seraient responsables, selon certains auteurs, d'interactions avec la chaîne respiratoire mitochondriale [160]. Ainsi, après la bioconversion, outre la dégradation de la 9-OH ellipticine en produits dérivés jouant le rôle d'agents pro-alkylants, nous aurions une possible inhibition du métabolisme oxydatif du champignon par divers métabolites formés. Ceci explique aussi la toxicité de certains métabolites. Nous n'avons pas remarqué, pour notre part, de production importante par conversion, de métabolite autre que la 9-OH ellipticine.

Tous ces éléments pourraient peut-être expliquer l'inefficacité ponctuelle de notre système fongique ou la limitation virtuelle des capacités de bioconversion de ce champignon. Un article récent propose une méthode d'observation directe de suivi de conversion fongique,

notamment d'hydroxylation, par RMN avec du deutérium marqué [161]. Cela permettrait de répondre à de nombreuses questions concernant cette transformation.

La probabilité de bioconversion est néanmoins supérieure à 0,8.

Nous avons essayé de synthétiser toutes ces réflexions sur un schéma présenté ci-dessous. La Figure IV.33 récapitule donc les principaux éléments dont nous avons parlé, tout en restant extrêmement prudent sur une éventuelle interprétation d'un tel schéma.

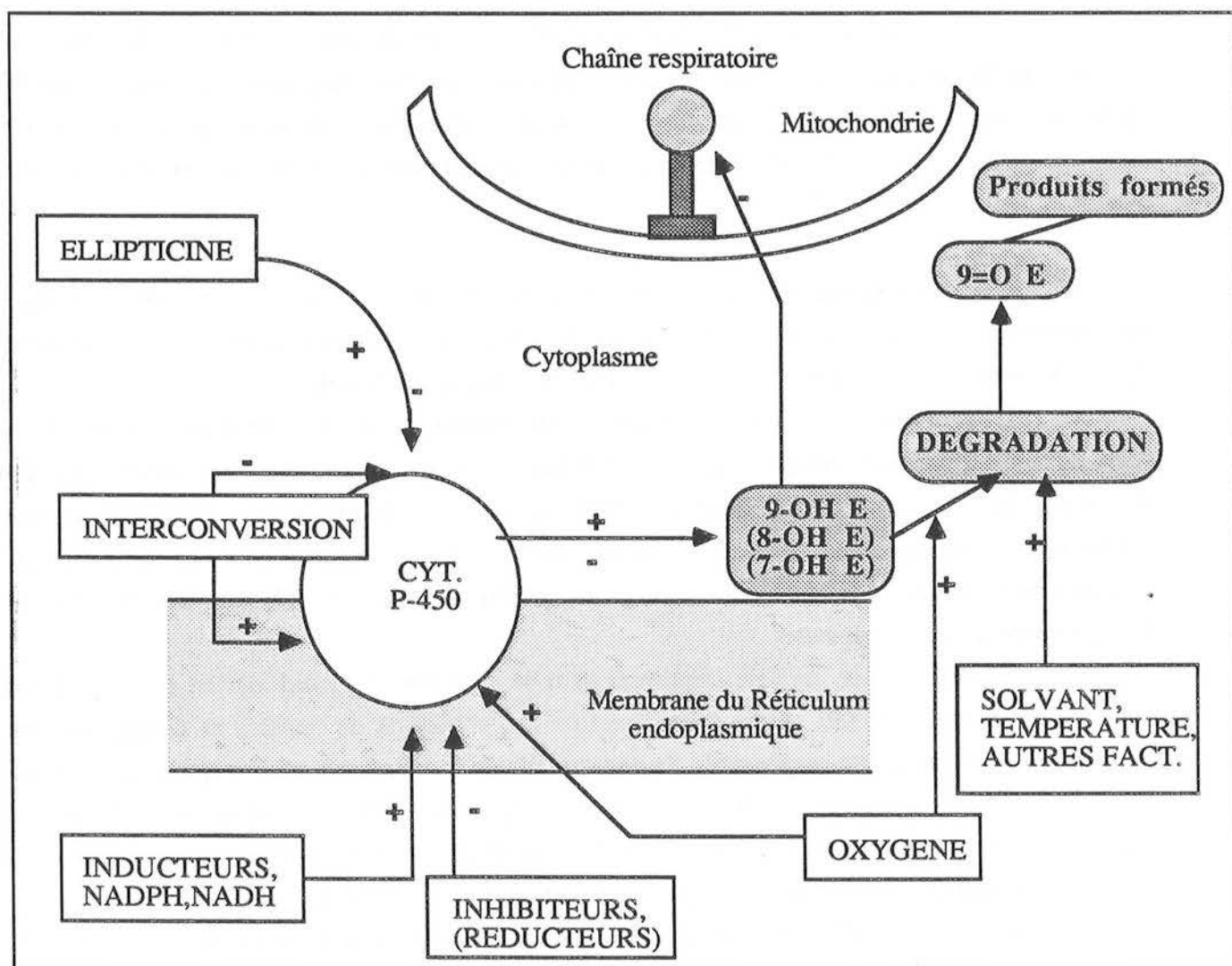


FIGURE IV.33 : SCHEMA RECAPITULATIF DE QUELQUES ELEMENTS INTERVENANT DANS LA BIOCONVERSION.

(+) INDUCTION OU ACTION; (-) INHIBITION OU SANS EFFET.

On peut essayer de donner une explication sur l'action de la vitamine C sur le système. La vitamine C s'oxyderait après un phénomène de compétition au niveau du site du cytochrome P-450 par rapport à l'Ellipticine.

IV.4 - OXYDATION BIOMIMETIQUE DE L'ELLIPTICINE

IV.4.1 - LES DIFFÉRENTS SYSTEMES TESTÉS

1 - *Système iodosylbenzene - métalloporphyrine*

Il n'a pas été possible de mettre en évidence par chromatographie sur couche mince la formation d'une quinone-imine résultant de la transformation chimique de l'Ellipticine par ce système.

Le remplacement dans le catalyseur du fer^{III} par le manganèse^{III} n'a pas permis d'amélioration, de même que l'utilisation d'une porphyrine de type fluorée [chloro-méso tetra (pentafluorophenyl) porphyrine de fer^{III} ou de manganèse^{III}].

De même, l'apport dans le milieu réactionnel d'un ligand de type imidazole ne permet pas de faire évoluer la réaction.

2 - *Iodylbenzène - acétylacétonate de vanadyle.*

Nous n'avons obtenu aucun résultat avec l'Ellipticine.

3 - *Système peroxyde d'hydrogène - Fer^{III}*

Son application à l'Ellipticine n'a pas donné de résultats.

4 - *Complexes peroxo du vanadium*

Dans ce cas également, il n'a pas été possible de mettre en évidence la formation de quinone-imine à partir de l'Ellipticine.

5 - *Système oxone-métalloporphyrine*

Il n'est jamais apparu de quinone-imine dans les essais effectués.

6 - *Système peroxyde d'hydrogène - Fer^{II}*

Dans le cas de l'Ellipticine, nous n'avons pu former de quinone-imine.

7 - *Système peroxyde d'hydrogène-Métalloporphyrine*

Les chloro-méso tétraphénylporphyrine de Fer^{III} ou de Manganèse^{III} ont été employées sans succès.

8 - *Oxydation par le sel de Fremy*

De cette tentative d'oxydation, il ressort que la molécule d'Ellipticine est rapidement transformée en quinone-imine et cela avec un rendement de 20 %.

La Figure IV.34 décrit la réaction réalisée.

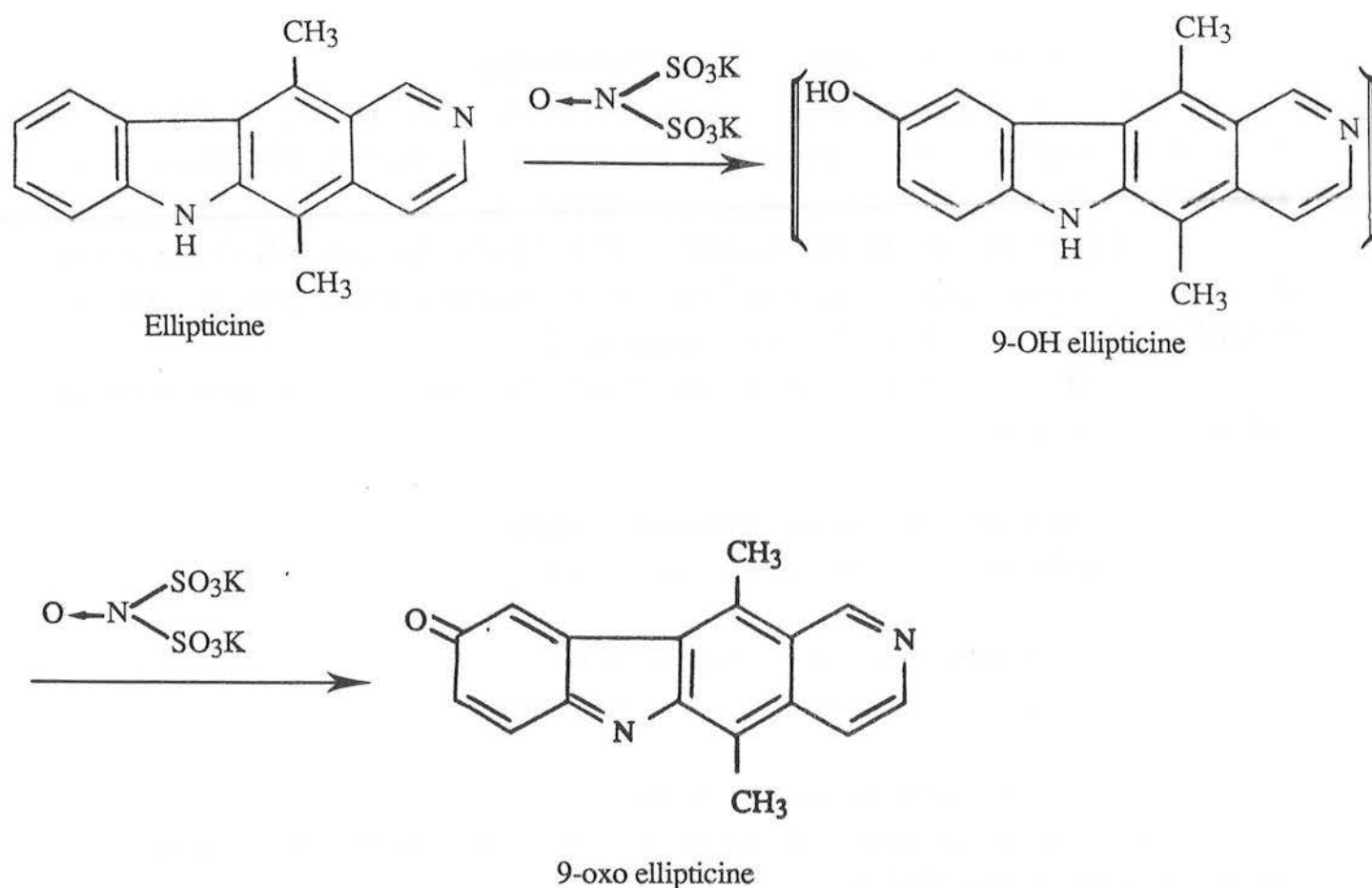


FIGURE IV.34 : OXYDATION DE L'ELLIPTICINE PAR LE SEL DE FREMY.

L'intermédiaire 9-OH ellipticine formé au cours de la réaction n'a pu être mis en évidence en raison de son oxydation facile en quinone-imine.

Ceci a été montré en traitant dans les mêmes conditions opératoires un échantillon d'hydroxy-9 ellipticine. Le produit d'oxydation de l'Ellipticine a été caractérisé par chromatographie, par ses données spectrales (Infra-Rouge et RMN) et par comparaison avec un échantillon de quinone-imine obtenu par oxydation de l'hydroxy-9 ellipticine par MnO_2 (cf. chapitre III-2-2-1) [162].

IV.4.2 - CONDITIONS OPÉRATOIRES

A une solution de 100 mg (0,4 nmole) d'Ellipticine dissoute dans 100 ml de chloroforme, on ajoute 570 mg (1,2 nmole) de sel de Fremy dissous dans 30 ml d'eau et 6 ml d'une solution aqueuse de KH_2PO_4 (0,17 mole.l⁻¹). Après l'addition goutte à goutte de l'oxydant (15 minutes) la phase organique est décantée. La phase aqueuse est à nouveau extraite par le chloroforme (2 fois 50 ml).

Les phases organiques sont séchées sur sulfate de sodium anhydre, puis concentrées. Le résidu brun-rouge obtenu est purifié par chromatographie sur une colonne de silice avec comme éluant le mélange benzène-chloroforme-éthanol (3/2/1 : v/v) identique à celui utilisé en couche mince. Après évaporation des fractions correspondantes, on obtient 20 mg d'une poudre rouge. Le rendement est de 20 %.

Après passage en chromatographie sur couche mince, avec le même éluant, on voit apparaître une tache rouge dont le R_f est de 0,60.

Les données spectrales de ce composé ont déjà été déterminées et sont les mêmes que celles de la 9-oxo ellipticine.

IV.4.3 - CONCLUSION

De ces essais, il ressort que seul le sel de Fremy est capable d'oxyder l'Ellipticine en quinone-imine et donc transitoirement en hydroxy-9 ellipticine qui est ensuite suroxydée. Il est à noter que cette réaction d'oxydation peut sans doute être optimisée par l'action d'un réducteur approprié permettant ainsi l'obtention du dérivé souhaité. La production de 9-OH ellipticine impose en effet la réduction de la 9-oxo ellipticine formée, comme nous l'avons déjà vu.

Par ailleurs, les oxydations biomimétiques réalisées ne sont pas exhaustives et l'utilisation d'autres systèmes peut être envisagée : système d'Udenfried [163], oxydes d'amine [164], peroxydes organiques [165].

CHAPITRE V

PREFAISABILITE INDUSTRIELLE

CONTENTS

STANDARDIZED ABBREVIATIONS

V - PREFAISABILITE INDUSTRIELLE

Nous allons étudier ici la pré faisabilité de notre procédé de conversion fongique de l'Ellipticine en 9-hydroxy ellipticine. Le but de cette petite étude, qui ne veut en aucun cas se substituer à une étude "professionnelle" d'un tel système, consiste à appréhender simplement l'aspect et l'intérêt financier de ce procédé.

Etant donné les difficultés rencontrées, liées à un tel procédé, nous avons pris en compte deux hypothèses de calcul.

V.1 - PROPOSITION D'UN PROCEDE GENERAL

V.1.1 - DESCRIPTION DU PROCÉDÉ

Le but du procédé est donc l'obtention de la 9-hydroxy ellipticine convertie par un système fongique, au sein d'un réacteur, à partir de l'Ellipticine.

Les différentes opérations nécessaires, présentées sur la Figure V.1, se résument donc de la façon suivante:

- Croissance du mycélium en réacteur (il est nécessaire d'optimiser cette phase);
- Récupération économiquement indispensable de l'Ellipticine non convertie, toujours dissoute dans le milieu de culture, par centrifugation : la biomasse et le milieu de culture seront ensuite traités séparément;
- Traitement de la biomasse par congélation (-20°C) dans un premier temps, puis trituration à l'aide d'un broyeur à billes;
- Extraction séparée du milieu de culture et de la biomasse broyée par l'acétate d'éthyle dans un extracteur liquide-liquide. Le milieu de culture est traité une seule fois tandis que la biomasse sera traitée deux fois. En sortie, on récupère la phase légère constituée du solvant organique dans lequel se trouve dissoutes l'Ellipticine résiduelle et la 9-hydroxy ellipticine formée;
- Evaporation des solvants (l'unité de distillation permettant de recycler l'acétate d'éthyle) qui permet l'obtention de l'Ellipticine et de la 9-hydroxy ellipticine sous forme solide;
- Reprise en méthanol puis séparation par chromatographie liquide préparative : les pics des substances sont alors récupérés et purifiés.

V.1.2 - CHOIX ET HYPOTHESES

V.1.2.1 - Un procédé "batch"

Le procédé envisagé est de type "batch". Un procédé continu au niveau de la conversion pourrait se révéler plus intéressant financièrement, mais la mise en œuvre d'un tel procédé est plus compliquée, au niveau de la stérilisation notamment.

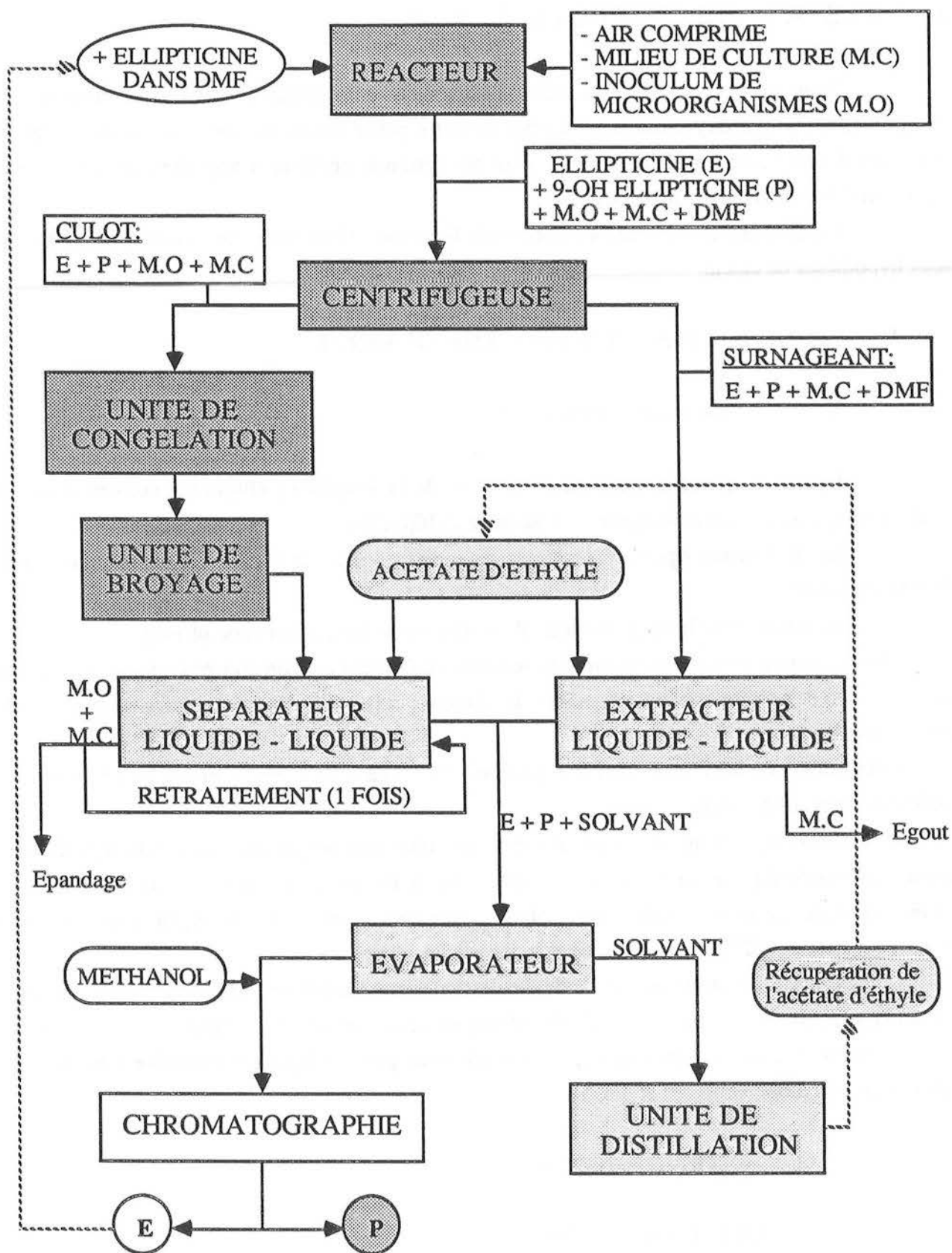


FIGURE V.1 : SCHEMA DU PROCEDE GENERAL.

Elle s'observe, de plus, moins fréquemment au niveau de l'industrie pharmaceutique. De plus, la réglementation en matière de produits pharmaceutiques empêcherait de mettre en œuvre un procédé où toutes les étapes (fermentation, extraction, etc...) seraient continues. La faible quantité demandée n'impose pas non plus un procédé continu.

V.1.2.2 - Extraction liquide-liquide

La quantité de solvant nécessaire à l'extraction des substances E (Ellipticine) et P (9-OH ellipticine formée), équivalente au volume de milieu de culture, est telle qu'il est indispensable de recycler l'acétate d'éthyle. De plus, le taux de récupération doit être suffisamment élevé pour rendre le procédé économiquement viable. Le taux de récupération utilisé ici est de 90%.

V.1.2.3 - Broyage et Centrifugation

Après avoir démontré de façon aussi nette la nécessité du broyage d'un champignon filamenteux tel qu'*Aspergillus alliaceus*, nous avons préconisé l'utilisation d'un broyeur à billes industriel. Ce type de broyeur, bien qu'encore à l'état de prototype, a néanmoins été conçu et réalisé pour un usage industriel, en Allemagne notamment. Nous nous sommes appuyés, pour le chiffrage d'une telle machine, sur son prix de laboratoire rapporté à un volume utile.

Le procédé de congélation employé pour extraire la substance P du mycélium n'imposait pas *a priori* d'utiliser une centrifugeuse pour séparer les microorganismes du milieu de culture. Cette solution a pourtant été retenue : une séparation par décantation n'est pas envisageable, car la densité du mycélium est proche de celle du milieu de culture; la filtration sur membrane de faible porosité, utilisée en laboratoire, n'est pas applicable industriellement.

V.1.2.4 - Hypothèses de bioconversion

Les résultats ont été calculés pour deux hypothèses qui concernent la quantité de biomasse que l'on peut espérer obtenir, et la quantité d'Ellipticine (E) qui pourra être transformée par unité de matière sèche. Ces paramètres dépendent de la configuration du réacteur permettant d'avoir le plus de biomasse possible et du taux de conversion de l'Ellipticine en 9-hydroxy ellipticine. Ces deux paramètres sont également étroitement liés à la qualité de la suspension produite. En effet, empêcher la formation de pellets accroît les transferts de matières nécessaires à la croissance fongique et favorise une bioconversion importante.

Les expériences réalisées, d'une part en erlenmeyers puis , d'autre part, sur le réacteur pulsé (l'"Hubstrahlbioreaktor") permettent de définir deux hypothèses d'obtention de biomasse :

- la première correspond à une production très faible de matière sèche soit 8 g.l^{-1} , systématiquement atteinte, que ce soit en erlenmeyer ou, *a fortiori*, en fermenteur. C'est ce que nous appellerons l'hypothèse "basse".

- la seconde hypothèse, ou hypothèse "haute", correspond à une biomasse moyenne atteinte dans tous les cas avec les conditions de fermentation optimales décrites auparavant sur le réacteur pulsé soit 12 g.l^{-1} .

De la même façon, les essais de bioconversion réalisés permettent de définir deux hypothèses de travail :

- la première hypothèse, ou hypothèse "basse", donne une production de $0,15 \text{ mg}$ de 9-OH ellipticine par gramme de matière sèche pour $0,5 \text{ mg}$ d'Ellipticine introduite. On remarque que cette valeur de $0,15 \text{ mg}$ de produit formé est déjà obtenue dans nos cultures en erlenmeyers.

- l'hypothèse "haute" de travail reproduit les résultats que nous avons obtenus en réacteur pulsé avec la production minimale de $0,6 \text{ mg}$ de 9-OH ellipticine formée par gramme de matière sèche. Nous définirons une quantité d'Ellipticine introduite de 2 mg par gramme de matière sèche (cela équivaut approximativement aux $500 \mu\text{g}$ d'Ellipticine introduits dans les erlenmeyers).

En résumé : **Hypothèse "haute"** : 20 g.m^{-3} de E donne 6 g.m^{-3} de P
avec une biomasse de 12 kg.m^{-3} .

Hypothèse "basse" : 5 g.m^{-3} de E donne $1,5 \text{ g.m}^{-3}$ de P
avec une biomasse de 8 kg.m^{-3} .

On note que les valeurs que nous avons ici validées sont issues de nos expérimentations et justifiées d'une part, par les analyses effectuées et, d'autre part, par le fait que ce sont des résultats tenant compte des dérivés oxydés formés.

V.2 - ETUDE DES COUTS

Afin d'éviter une lecture fastidieuse des coûts, nous avons résumé sur différents tableaux les chiffres auxquels nous sommes parvenus pour une hypothèse définie et pour des prix d'Ellipticine et de 9-OH ellipticine de 1 000 et 4 000 Francs le gramme (hypothèses définies et minorées à partir du prix de vente de l'Ellipticine et de son dérivé 9-hydroxylé mentionnés par Sigma®).

Le Tableau V.1 précise l'investissement initial (en millions de francs) nécessaire et son amortissement sur 5 ans pour différentes quantités de produits par an et selon les deux hypothèses de travail précédemment définies.

	10 KG DE PRODUIT PAR AN		25 KG DE PRODUIT PAR AN		50 KG DE PRODUIT PAR AN	
	HYP.BASSE	HYP.HAUTE	HYP.BASSE	HYP.HAUTE	HYP.BASSE	HYP.HAUTE
REACTEURS	11	4	26	8	51	14
CENTRIFUGEUSE	1,5	1,5	3	1,5	6	1,5
BROYEUR A BILLES	1,5	1,5	3	1,5	6	1,5
EXTRACTEUR Liq./Liq.	3	3	6	3	9	3
SEPARATEUR Liq./Liq.	1	1	2	1	3	1
UNITE CONGELATION	1	1	2	1	3	1
EVAPORATEUR	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1
UNITE DISTILLATION	3	3	6	3	9	3
CHROMATOGRAPHIE	6	6	18	18	36	36
CUVES DE STOCKAGE	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1
POMPES	1,2	1	2,5	1,1	4,1	1,3
TOTAL	29,4	22,2	68,9	38,3	127,7	62,5
AMORTISSEMENT SUR 5 ANS	5,88	4,44	13,78	7,66	25,54	12,5

TABLEAU V.1 : INVESTISSEMENT INITIAL (EN MILLIONS DE FRANCS).

MILIEU DE CULTURE	COMPOSITION	COUT UNITAIRE (EN FRANCS)	COUT
Eau stérile	1 m3	100	100
Glucose	20 kg	15	300
NaCl	5kg	3,95	19,75
KH ₂ PO ₄	5kg	40	200
Extrait de levure	5kg	30	150
Extrait de soja	5kg	52	260
TOTAL (F/m3)			1029,75
AUTRES MATIERES			
9-OH ellipticine	F/kg	4 000 000	
Ellipticine	F/kg	1 000 000	
Diméthylformamide (DMF)	F/m3	30 000	
Acétate d'éthyle	F/m3	25 000	
Méthanol	F/m3	30 000	
UTILITES			
Air comprimé	F/Nm3	0,05	
Vapeur	F/t	190	
HYPOTHESES DE TRAVAIL			
Ellipticine introduite	g/m3	20	
9-OH ellipticine récupérée	g/m3	6	
Ellipticine non convertie	% récupération	80	
Acétate d'éthyle	% récupération	90	
PRODUITS	UNITES	QUANTITES	COUT (FRANCS)
9-OH ellipticine	kg	10	
Ellipticine	kg	15	15 000 000
Diméthylformamide (DMF)	m3	33	1 000 000
Acétate d'éthyle	m3	200	5 000 000
Méthanol	m3	29	870 000
Milieu de culture	m3	1667	1 716 600
TOTAL MATIERES	FRANCS		23 586 600
Air comprimé	Nm3	4 000 000	200 000
Vapeur	tonne	1 200	228 000
TOTAL UTILITES			428 000

TABLEAU V.2 : TABLEAU DES MATIERES ET DE LEURS COUTS.

	UNITES	QUANTITE	PRIX UNITAIRE	COUT ANNUEL	COUT PAR Kg
PRODUCTION DE PRODUIT	kg	10			
<i>MATIERES PREMIERES</i>					
Ellipticine	kg	15	1 000 000	15 000 000	1 500 000
Milieu de culture	m3	1 667	1 030	1 716 600	171 660
Diméthylformamide	m3	33	30 000	1 000 000	100 000
Acétate d'éthyle	m3	200	25 000	5 000 000	500 000
Méthanol	m3	29	30 000	870 000	87 000
TOTAL MAT. PREMIERES				23 586 600	2 358 660
<i>UTILITES</i>					
Energie électrique	Kwh	800 000	0,5	400 000	40 000
Vapeur	tonne	1 200	190	228 000	22 800
Air comprimé	m3	4 000 000	0,05	200 000	20 000
TOTAL UTILITES				828 000	82 800
<i>FRAIS DE TRANSFORMATION</i>					
Appointements : Ingénieur		1	1 000 000	1 000 000	100 000
Main d'œuvre		1	600 000	600 000	60 000
TOTAL FRAIS DE TRANSF.				1 600 000	160 000
TOTAL				26 014 600	2 601 460
AMORTISSEMENTS				4 440 000	444 000
TOTAL AVEC AMORTISSEMENT				30 454 600	3 045 460

TABLEAU V.3 : COUTS DE PRODUCTION DE LA 9-OH ELLIPTICINE D'APRES L'HYPOTHESE HAUTE
(20 g de E et 6 g de P).

Le Tableau V.2 donne les matières nécessaires et leurs coûts pour l'hypothèse "haute" de travail et considérant, toujours d'après nos résultats, que l'on récupère 80% de l'Ellipticine non convertie et 90% de l'acétate d'éthyle utilisé.

Le Tableau V.3 définit le coût de la production de 9-OH ellipticine (10 kg par an) selon l'hypothèse haute.

V.3 - CONCLUSION

La conversion de E en P est réalisable industriellement. Elle utilise des procédés classiques de l'industrie pharmaceutique. La Figure V.2 montre les courbes obtenues définissant le prix au kg par rapport à la production annuelle de 9-OH ellipticine selon les hypothèses de travail.

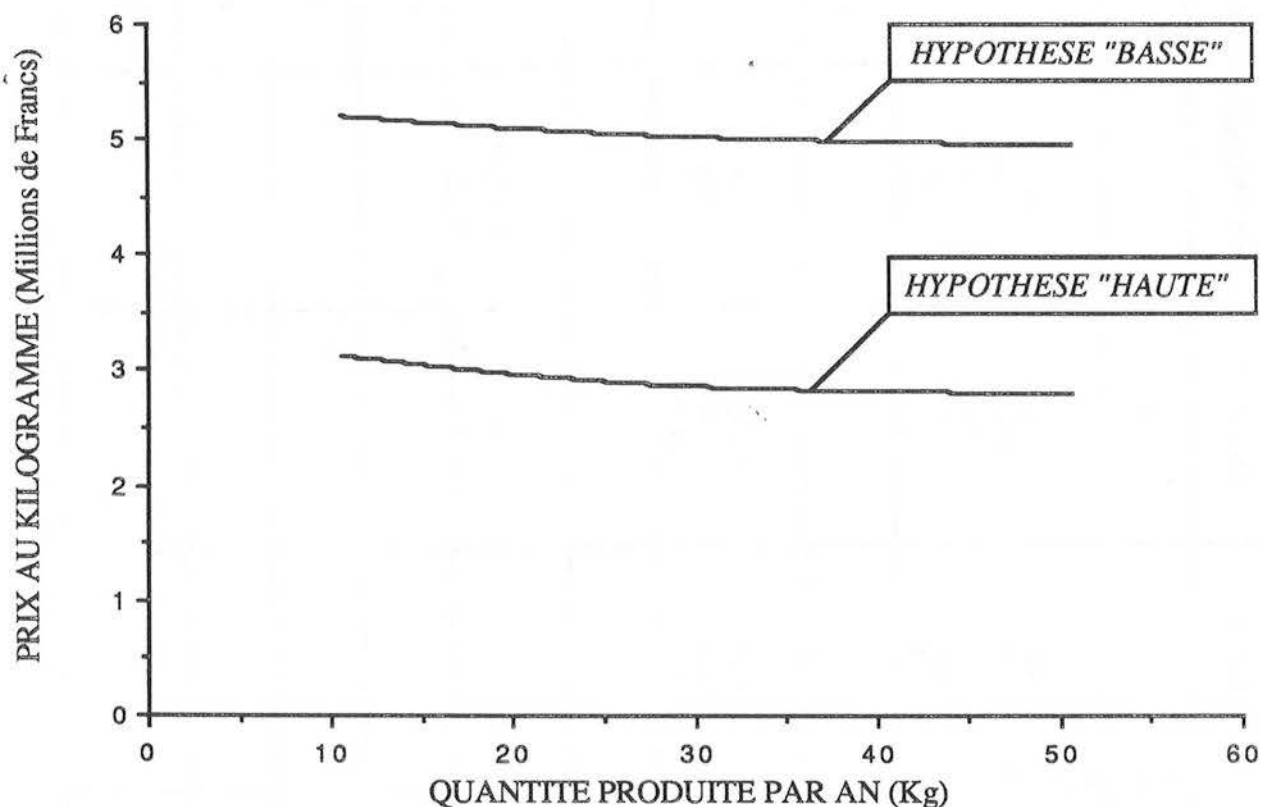


FIGURE V.2 : PRIX DE PRODUCTION PAR KG ET PAR AN DE 9-OH ELLIPTICINE SELON LES HYPOTHESES DE TRAVAIL.

Les résultats démontrent que l'hypothèse "haute" (introduire 20 g de E pour obtenir 6 g de P avec une formation de 12 g.l^{-1} de matière sèche) entraîne des coûts de production nettement moins élevés que l'hypothèse "basse" (introduire 5g de E pour obtenir 1,5g de P avec une formation de 8 g.l^{-1} de matière sèche). La différence est essentiellement due au coût du milieu de culture et de l'acétate d'éthyle supplémentaires nécessaires pour obtenir les mêmes quantités de P.

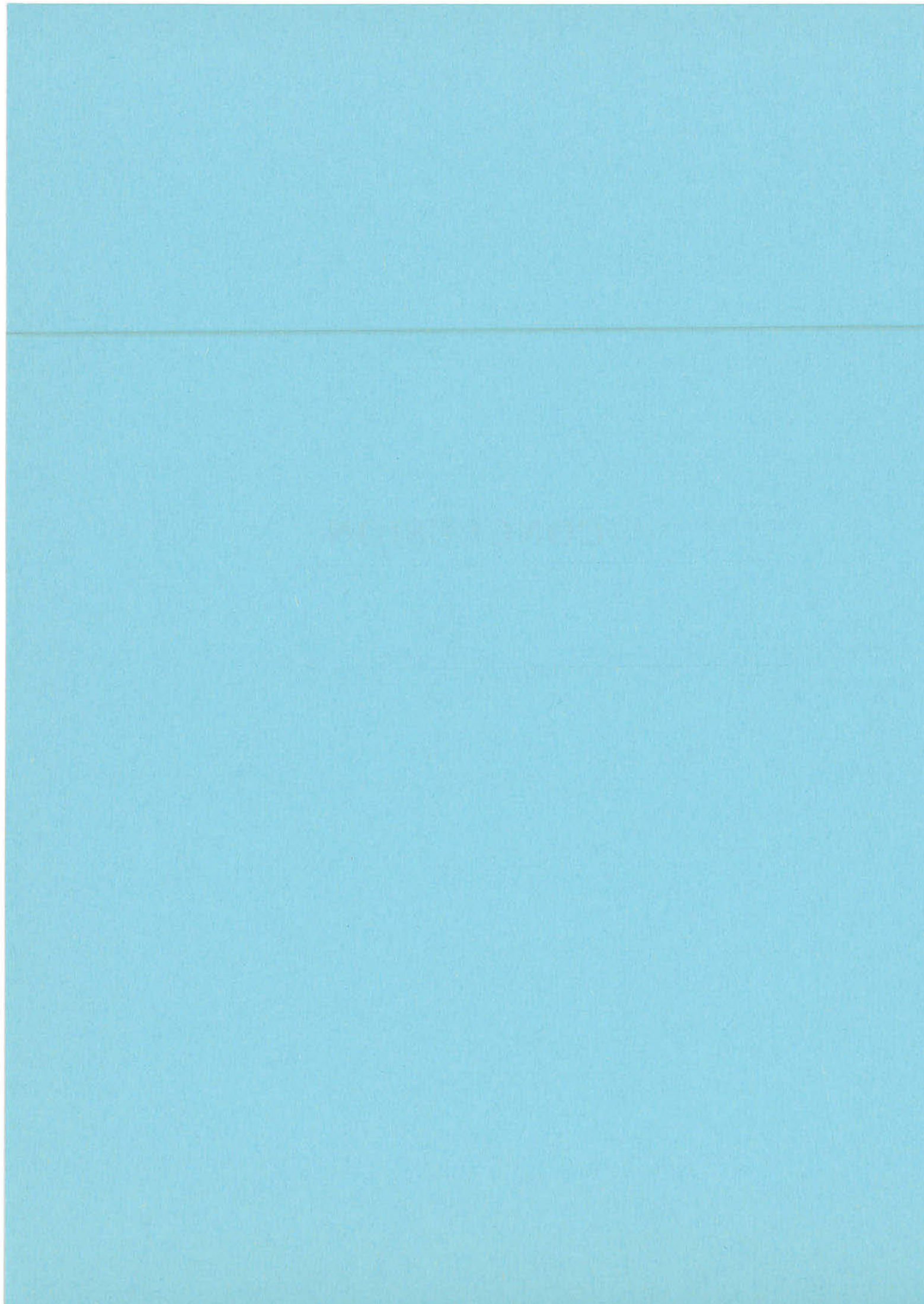
Par ailleurs, il est à noter que 80% du coût de production annuel est dû aux matières premières, ce qui explique que le prix au kilogramme de P décroisse presque linéairement en fonction de la quantité de P produite. On aurait, évidemment, intérêt à produire la quantité de P la plus importante possible. Mais il ne faut pas oublier que le marché se situe en France à quelques dizaines de kilogrammes par an.

Les hypothèses de travail considérées ont été validées sur la base de nos résultats et se situent toutes les deux dans une limite basse de valeurs. En prenant pour P un prix de vente moyen de 5000 F/g, le procédé est rentable dans l'hypothèse que nous avons considérée comme "haute" et qui se révèle en fait comme une hypothèse moyenne atteinte pratiquement dans tous les cas.

Le temps de retour d'une telle installation qui est le temps au bout duquel les bénéfices couvrent l'investissement initial, est d'environ un an.

L'oxydation chimique de l'Ellipticine a été réalisée dans les derniers mois de ce travail et nous n'avons pu procéder à une telle étude de pré faisabilité afin de comparer les deux procédés.

CONCLUSION



CONCLUSION

Le but de ce travail consistait à produire de la 9-OH ellipticine, agent anti-tumoral très efficace contre plusieurs formes de cancers chez l'homme, par un système différent de celui de la synthèse chimique.

L'étude réalisée démontre la possibilité de procéder à l'oxydation enzymatique de l'Ellipticine par un système fongique. La souche *Aspergillus alliaceus* et, à un degré moindre, la souche *Cunninghamella echinulata*, effectuent des réactions d'oxydation par l'intermédiaire du système des monooxygénases à cytochrome P-450 permettant de former un dérivé 9-hydroxylé à partir de l'Ellipticine.

La méthode de bioconversion de l'Ellipticine décrite dans cette étude présente une efficacité supérieure à celle mentionnée dans la littérature. Les résultats montrent, en effet, que cette méthode consistant en un traitement du mycélium et un contact limité de l'Ellipticine avec le système fongique suffit pour réaliser une transformation de notre alcaloïde. L'utilisation d'un réacteur de type "pulsé", tendant à augmenter les transferts de matières par rapport à un réacteur normal, démontre que l'exploitation du mécanisme de cisaillement mis en jeu dans ce type de réacteur permet d'accroître les rendements de biomasse fongique ainsi que les taux de transformation.

Ainsi, par rapport à un procédé classique de bioconversion de l'Ellipticine, notre méthodologie permet l'obtention d'une production moyenne doublée, voire triplée, de 9-OH ellipticine pour un temps de culture réduit de moitié sur des cultures effectuées au laboratoire. Sur des essais réalisés en fermenteur, les taux de conversion obtenus montrent que la durée de culture est divisée par 4 pour une production de 9-OH ellipticine triplée.

Au cours de ces expériences, nous avons cependant rencontré des difficultés liées à la dégradation de la 9-OH ellipticine en une forme quinone-imine. Nous avons mis au point une réaction colorimétrique qui permet de quantifier les dérivés oxydés formés à partir de la 9-OH ellipticine. La possibilité de recourir à des réducteurs pour stabiliser ce dérivé 9-hydroxylé, peu stable, a été démontrée *in vitro* avec l'utilisation de la vitamine C. Cependant, l'inefficacité de ce réducteur *in vivo* amoindrit considérablement son intérêt : on pourrait expliquer cet effet par un phénomène de compétition entre l'Ellipticine et la vitamine C au niveau du site actif du cytochrome P-450. L'addition d'un agent complexant tel que l'E.D.T.A *in vivo*, semblerait en revanche plus efficace.

Nous avons pu, aussi, réaliser une oxydation biomimétique de l'Ellipticine par un système chimique oxydant proche de celui du cytochrome P-450 tel que le sel de Fremy. Cette réaction conduit à la formation de 9-oxo ellipticine.

L'oxydation de l'Ellipticine en position 9 semble donc plus spécifique et se réalise dans des conditions beaucoup plus douces au sein d'un système fongique.

L'étude de préfaisabilité industrielle que nous avons faite montre que la bioconversion de l'Ellipticine serait susceptible de remplacer la synthèse chimique de la 9-OH ellipticine. Cette constatation est amplifiée par le fait que les hypothèses de travail définies sont en fait des hypothèses moyennes largement réalisables.

Cependant en vue de l'optimisation du procédé, plusieurs éléments restent à approfondir :

- l'étude de la cytologie de ce champignon pour connaître parfaitement le matériel vivant;
- la détermination d'une souche génétiquement stable pour éviter la perte de la capacité de bioconversion de la souche;
- l'influence des éléments tels que l'oxygène, les inducteurs possibles, les réducteurs utilisables...

De nombreuses perspectives de travail peuvent, de plus, étayer et poursuivre cette étude. On pourrait, par exemple, élargir l'utilisation de cette méthodologie à d'autres molécules. On peut aussi tenter des essais de bioconversion sur le matériel fongique immobilisé : champignon entier ou spores. Dans ce dernier cas, on se situerait, alors, dans l'optique d'un "spore process", technique prometteuse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CROS S. *l'Opéron*. 1988, 14 (4), 16-24.
- [2] LE PECQ J.B., DAT-XUONG N., GOSSE C., PAOLETTI C.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974, 71, 5078-5082.
- [3] DAT-XUONG N., ADELIN M.T., LECOINTE P., JANOT M.M.
C.R. Acad. Sci. Paris. 1975, Série C, 281, 623-626.
- [4] JURET P., TANGUY A., GIRARD A., LE TALAER J.Y., DAT-XUONG N.,
ABBATUCCI J.S. *Nouv. Presse. Med.* 1979, 8, 1495-1498.
- [5] MANSUY D. Activation des composés organiques exogènes par les Cytochromes
P-450. Implications en pharmacologie et en toxicologie. In : G. Siest & C. Heusghem.
Mise au point de biochimie pharmacologique. Masson Paris.
1979, 2^{ème} série, 123-146.
- [6] BAN Y., MURAKAMI Y., IWASANA Y., TSUCHIYA M., TAKANO N.
Med. Res. Rev. 1988, 8 (2), 231-308.
- [7] GOODWIN S., SMITH A.F., HORNING E.C. *J. Am. Chem. Soc.*
1959, 81, 1903-1908.
- [8] DALTON L.K., DEMERAC S., LELMES B.C., LODER J.W., TEITEI T.,
SWAN J.M. *Austr. J. Chem.* 1967, 20, 2715-2727.
- [9] SVOBODA G.H., POORE G.A., MONTFORT M.L. *J. Pharm. Sci.*
1968, 57, 1720-1725.
- [10] LEE I.P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1976, 196, 525-535.
- [11] PAOLETTI C., LE PECQ J.B., DAT-XUONG N., JURET P., AMIEL J.L.
GARNIER H. *Recent Results Cancer. Res.* 1980, 74, 107-123.
- [12] MATHE G., HAYAT M., DE VASSAL F., SCHWARZENBERG L.
SCHLUMBERGER J.R., SCHNEIDER M. *Rev. Eur. et. Clin. Biol.*
1970, 15, 541-545.

- [13] ANSARI B.M., THOMPSON E.N. *Postgrad. Med. J.* 1975, 51, 103-105.
- [14] FESTY B., POISSON J., PAOLETTI C. *FEBS Letters*. 1971, 17, 321-323.
- [15] PAOLETTI C., LESCA C., CROS S., MALVY C., AUCLAIR C.
Biochem. Pharmacol. 1979, 28, 345-350.
- [16] GUTHRIE R.W., BROSSI A., MENNONA F.A., MULLIN J.G., GRUNBERG E.,
KIERSTEAD R.W. *J. Med. Chem.* 1975, 18 (7), 755-760.
- [17] LE PECQ J.B, GOSSE C., DAT-XUONG N., PAOLETTI C. *C.R. Acad. Sci. Paris*.
1973, Série D, 277, 2289-2291.
- [18] JURET P., TANGUY A., GIRARD A., LE TALAER J.Y., DAT-XUONG N.,
ABBATUCCI J.S. *Eur. J. Cancer*. 1978, 14, 205-206.
- [19] MULTON E., RIOU J.F., LEFEVRE D., AHOMADEGBE J.C., RIOU G.,
Biochem. Pharmacol. 1989, 38(13), 2077-2086.
- [20] KOHN K.W, ROSS W.E, GLAUBIGER D. Ellipticine. In : Antibiotics : "Mechanism
of action of antieukaryotic and antiviral compounds (Hahn F.E Editor).Berlin,
W.germany, Springer-Verlag©. 1979, vol.5, Part.2, pp 195-213.
- [21] MALVY C. La série des Ellipticines. Contribution à la connaissance du mécanisme
d'action. Thèse de doctorat d'état ès Sciences Physiques. Université Paris VI - Jussieu.
1982, 240 p.
- [22] RAHMAN A., CRADOCK J.C., DAVIGNON J.P. *J. Pharm. Sci.* 1978, 67, 611-614.
- [23] PAOLETTI C., CROS S., DAT-XUONG N., LECOINTE P., MOISAND A.
Chem. Biol. Interact. 1979, 25, 45-58.
- [24] TERCE F., TOCANNE J.F., LANEELLE G. *Eur. J. Biochem.* 1983, 133, 349-354.
- [25] ALAZARD R., BOCQUET P.L., PAOLETTI C. *FEBS Letters*.
1976, 63 (2), 278-282.

- [26] TRAGANOS F., STAIANO-COICO L., DARZYNKIEWICZ Z., MELAMED M.R. *Cells Cancer. Res.* 1980, 40, 2390-2399.
- [27] LECOINTE P., PUGET A. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 1983, Série III, 296, 279-282.
- [28] MALVY C., PAOLETTI C. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* 1983, 19, 863-865.
- [29] JACQUEMIN-SABLON A., CHARCOSSET J.Y., BENDIRDJIAN J.P., DELAPORTE C., GUERINEAU S., LANTIERI M.F. New-adjuvant Chemotherapy. Colloque INSERM, John Libbey eurotext Ltd.© 1986, 137, 83-89.
- [30] LECOINTE P., LESCA P., CROS S., PAOLETTI C. *Chem. Biol. Interact.* 1978, 20, 113-121.
- [31] PAOLETTI C., LECOINTE P., LESCA P., CROS S., DAT-XUONG N., MANSUY D. *Biochimie.* 1978, 60, 1003-1009.
- [32] AMES B.N., MC CANN J., YAMASAKI E. *Mutat. Res.* 1975, 31, 347-364.
- [33] UDAKA S., MIYASHIRO S. *J. Antibiot.* 1982, 35 (10), 1312-1318.
- [34] LESCA P., LECOINTE P., PAOLETTI C., MANSUY D. *Biochimie.* 1978, 60, 1011-1018.
- [35] LESCA P., LECOINTE P., PAOLETTI C., MANSUY D. *Chem. Biol. Interact.* 1979, 25, 279-287.
- [36] AUCLAIR C., HYLAND K., PAOLETTI C. *J. Med. Chem.* 1983, 26, 1438-1444.
- [37] MEUNIER B., AUCLAIR C., BERNADOU J., MEUNIER G., CROS S., MAFTOUH M. *Dev. Pharmacol.* 1983, 3, 149-181.
- [38] MEUNIER G., MEUNIER B., AUCLAIR C., BERNADOU J., PAOLETTI C. *Tetrahedron.* 1983, 24 (4), 365-368.
- [39] PRATVIEL G., BERNADOU J., HA T., MEUNIER G., MEUNIER B., CROS S. *J. Med. Chem.*, 1986, 29, 1350-1355.

- [40] AUCLAIR C. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987, 259 (1), 1-14.
- [41] MEUNIER G., DE MONTAUZON D., BERNADOU J., GRASSY G., CROS S., BONNAFOUS M. *Mol. Pharmacol.* 1988, 33, 93-102.
- [42] BRAHAM Y., MEUNIER G., MEUNIER B. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 1987, Série III, 304 (11), 301-306.
- [43] SAINSBURY M. *Synthesis.* 1977, 437-448.
- [44] COON M.J., CHIANG Y.L., FRENCH J.S. Chemical characterization of the enzymes involved in drug metabolism. In : *Induction of Drug Metabolism.* Edited by R.W Estabrook & A. Lindenlaub. 1979, 201-211.
- [45] LESCA P., LECOINTE P., PAOLETTI C., MANSUY D. *Biochem. Pharmacol.* 1978, 27, 1203-1209.
- [46] LESCA P., LECOINTE P., PAOLETTI C., MANSUY D. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 1976, Série D, 282, 1457-1460.
- [47] LESCA P., MONSARRAT B., CROS S., PAOLETTI C. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1981, 67, 871-876.
- [48] LESCA P., RAFIDINARIVO E., LECOINTE P., MANSUY D. *Chem. Biol. Interact.* 1979, 24, 189-198.
- [49] LESCA P., LECOINTE P., PAOLETTI C., MANSUY D. *Biochem. Pharmacol.* 1977, 26, 2169-2173.
- [50] MALVY C., PAOLETTI C. *Biophys. Res. Comm.* 1980, 96, 363-369.
- [51] CROS S., SORBARA R., MOISAND CH., DAT-XUONG N., PAOLETTI C., LECOINTE P. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1975, 33, 484-497.
- [52] ALBERICI G.F., BIDART J.M., MOINGEON P., PAILLER S., GOODMAN A., MONDESIR J.M. *Biochem. Pharmacol.* 1985, 34 (10), 1701-1704.
- [53] CHARCOSSET J.Y., JACQUEMIN-SABLON A., LE PECQ J.B. *Biochem. Pharmacol.* 1984, 33 (14), 2271-2275.

- [54] ARTEAGA C.L., KISNER D.L., GOODMAN A., VON HOFF D.D.
Eur. J. Cancer. Clin. Oncol., 1987, 23 (11), 1621-1626.
- [55] AUCLAIR C., PIERRE A., VOISIN E., PEPIN O., CLOAS C., CROS S.
Cancer Res. 1987, 47, 6254-6261.
- [56] CRANWELL P.A., SAXTON J.E. *J. Chem. Soc.* 1962, 3482-3487.
- [57] SAINSBURY M., WEERASINGHE D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*,
1982, 587-590.
- [58] RIVALLÉ C., WENDLING F., TAMBOURIN P., LHOSTE J.M.,
CHERMANN J.C., BISAGNI E. *J. Med. Chem.* 1983, 26, 181-185.
- [59] HÉWLINS M.J.E., OLIVEIRA-CAMPOS A.M., SHANNON P.V.R.
Synthesis. 1984, 4, 289-302.
- [60] MAY C., MOODY C.J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*. 1988, 247-250.
- [61] LARUE L., RIVALLÉ C., MUZARD G., PAOLETTI C., PAOLETTI J.
BISAGNI E. *J. Med. Chem.* 1988, 31, 1951-1956.
- [62] RATCLIFFE A.J., SAINSBURY M., SMITH A.D., SCOPES D.I.C.
Chem. Soc. Perkin Trans I. 1988, 2933-2943.
- [63] GANSSER C., VIEL C., VIOSSAT B., RODIER N., MERIENNE C.
Il Farmaco Ed. Sc., 1988, 43 (4), 301-309.
- [64] MILLER R.B., DUGAR S. *Tetrahedron*. 1989, 30 (3), 297-300.
- [65] GRIBBLE G.W., FLETCHER G.L., KETCHA D.M., RAJOPADHYE M.
J. Org. Chem. 1989, 54, 3264-3269.
- [66] BESSODES M., DAT-XUONG N., ANTONAKIS K. *C.R. Acad. Sci. Paris*.
1976, Série C, 282, 1001-1002.
- [67] HA T., BERNADOU J., MEUNIER B. *Nucleos. Nucleot.* 1987, 6 (4), 691-698.

- [68] LANGENDOEN A., KOOMEN G.J., PANDIT U.K. *Tetrahedron*. 1988, 44 (12), 3627-3631.
- [69] JONSSON J., ERIKSSON L., HELLBERG S., SJOSTROM M., WOLD S. *Acta Chemica Scandinavia*. 1989, 43, 286-289.
- [70] BISAGNI E., NGUYEN C.H., PIERRE A., PEPIN O., GROS P., DE COINTET P. *J. Med. Chem.* 1988, 31, 398-405.
- [71] PIERSON V., PIERRE A., DE COINTET P., NGUYEN C.H., GROS P. BISAGNI E. *Biochem. Pharmacol.* 1989, 38 (9), 1395-1406.
- [72] LANGENDOEN A., PLUG J.P.M., KOOMEN G.J., PANDIT U.K. *Tetrahedron*. 1989, 45 (6), 1759-1762.
- [73] KANSAL V.K., FUNAKOSHI S., MANGENEY P., POTIER P., GUITTET E., GILLET B. *Tetrahedron*. 1984, 25 (22), 2351-2354.
- [74] OMURA T., HARADA N., YOSHIOKA H. Comparative biochemistry of animal, plant and microorganism oxidases. *Pestic. Chem. Hum. Welfare Environ., Proc. Int. Congr. Pestic. Chem., 5th*. 1982. Ed. by Miyamoto, Pergamon Oxford. 1983, 3, 255-262.
- [75] RIVIERE J.L., CABANNE F. *Biochimie*. 1987, 69, 743-752.
- [76] WICKRAMASINGHE R. *Enzyme*. 1975, 19, 348-376.
- [77] GUENGERICH F.P. *Biochem. Physiol.* 1988, 89 (1), 1-4.
- [78] OMURA T., SATO R. *J. Biol. Chem.* 1964, 239, 2370-2378.
- [79] ESTABROOK R.W. Cytochrome P-450 and oxygenation reactions : a status report. In : *Drug Metabolism and Drug toxicity*. Ed. by Mitchell J.R, Horning Mg Raven, New York. 1984, pp 1-20.
- [80] PETERSON J.A. *Fundam. Res. Homogenous Catal.* 1979, 3, 729-750.
- [81] BANSAL S.K., LOVE J., GURTOO H.L. *Biochem. Biophys. Res. Communications*. 1983, 117, 268-274.

- [82] RUCKPAUL K., BERNHARDT R. Biochemical Aspects of the Monooxygenase System in the Endoplasmic Reticulum of Mammalian Liver. In : Cytochrome P-450. Ed. by Ruckpaul K. & Rein H. Akademie-Verlag© Berlin. 1984, Chap. I, p. 5-57.
- [83] ROSAZZA J.P., SMITH R.V. Microbial Models for Drug Metabolism. In : Advances in Applied Microbiology. Academic Press Inc. 1979, 25, 169-208.
- [84] MANSUY D., BATTIONI P. Particular ability of cytochromes P-450 to form reactive intermediates and metabolites. In : Drug Metabolism - Molecular approaches and Pharmacological Implications. Ed. by G. Siest, Pergamon Press. 1985, p 195-203.
- [85] GUENGERICH F.P. *Cancer. Res.* 1988, 48, 2946-2954.
- [86] BOUZON J. Dealkylation au moyen de microsomes de foie de rat immobilisés. D.E.A de CHIMIE ANALYTIQUE; E.N.S.M.S.E, 1985.
- [87] BRESKVAR K., CRESNAR B., HUDNIK-PLEVNIK T. *J. Steroid Biochem.* 1987, 26 (4), 499-501.
- [88] SMITH R.V., ACOSTA J.R., ROSAZZA J.P. *Adv. Biochem. Eng.* 1977, 5, 70-100.
- [89] BEGUE J.M., GUILLOUZO C., PASDELOUP N., GUILLOUZO A. *Hepatology.* 1984, 4, 839-842.
- [90] GUILLOUZO A., CLEMENT B., BEGUE J.M., GUGUEN-GUILLOUZO C. Human hepatocyte cultures in the assessment of drug metabolism in man. In : Drug Metabolism - Molecular approaches and Pharmacological Implications. Ed. by G.Siest - Pergamon Press. 1985, p.19-24.
- [91] KURZ W.G.W, CONSTABEL F. Plant Cell Cultures, a potential Source of Pharmaceuticals. In : Advances in Applied Microbiology. Academic Press Inc. 1979, 25, 209-240.
- [92] SIMPSON A.P., KELLY S.I. *Plant. Sci.* 1989, 60, 231-236.
- [93] KOUADIO K., RIDEAU M., GANSER C., CHENIEUX J.C., VIEL C. *Plant Cell Reports.* 1984, 3, 203-205.
- [94] CHIEN M.M., ROSAZZA J.P. *Drug Metab. Disp.* 1979, 7, 211-214.

- [95] DAVIS P.J. Microbials Transformations of Alkaloids. In : Microbial Transformations of bioactive Compounds, Vol II., J.P. Rosazza Ed., CRC Press, Boca Raton, Fl. 1982, Ch. III, pp 67-90.
- [96] SMITH R.V., ROSAZZA J.P. *J. Pharm. Sci.*, 1975, 64, 1737-1759.
- [97] SMITH R.V., ROSAZZA P. *Biotechn. Bioeng.* 1975, 17, 785-814.
- [98] SMITH R.V., ROSAZZA J.P. Microbial Transformations as a means of preparing Mammalian Drug Metabolites. In : Microbial Transformations of bioactive Compounds, Vol II., J.P. Rosazza Ed., C.R.C Press, Boca Raton, Fl., 1982, Ch.I, pp 1-42.
- [99] SMITH R.V., ROSAZZA J.P. *Arch. Biochem. Biophys.* 1974, 161, 551-558.
- [100] DAVIS P.J., YANG S.K., SMITH R.V. *Appl. Environn. Microbiol.* 1984, 48, 327-331.
- [101] WISEMAN A. Microbial Cytochromes P-450 : Drug applications. In : Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. Ellis Horwood Ltd Pub., 1977, 172-184.
- [102] BRANNON D.R., HORTON D.R., SVOBODA G.H. *J. Med. Chem.* 1974, 17, 653-654.
- [103] BETTS R.E., WALTERS D.E., ROSAZZA J.P. *J. Med. Chem.*, 1974, 17, 599-602.
- [104] OHLSON S., FLYGARE S., LARSSON P.O., MOSBACH K. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1980, 10, 1-9.
- [105] CHIEN M.M., ROSAZZA J.P. *J. Nat. Prod.*, 1979, 42, 643-647.
- [106] TROWER M.K., SARIASLANI F.S., O'KEEFE D.P. *J. Bacteriol.* 1989, 171 (4), 1781-1787.
- [107] DUPPEL W., LEBEAULT J.M., COON M.J. *Eur. J. Biochem.* 1973, 36, 583-592.
- [108] SANGLARD D., KAPPELI O., FIECHTER A. *J. Bacteriol.* 1984, 157, 297-302.
- [109] AMBIKE S.H., BAXTER R.M. *Phytochemistry.* 1970, 9, 1959-1962.

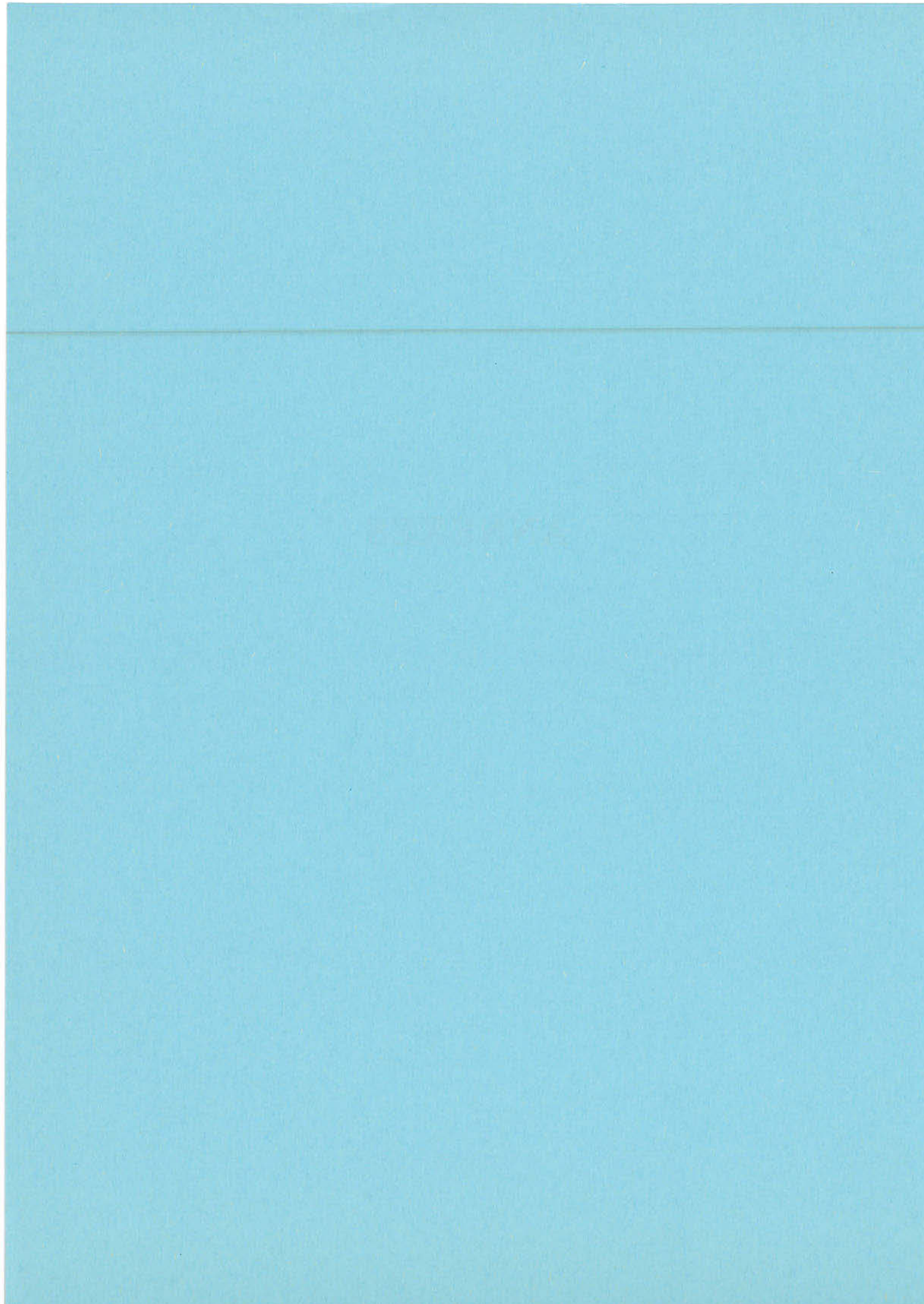
- [110] FUKUI S., TANAKA A. *Ann. Rev. Microbiol.* 1982, 36, 145-172.
- [111] MOSBACH K., LARSSON P.O. *Biotechn. Bioeng.* 1970, 12, 19-27.
- [112] SEDLACZEK L., JAWORSKI A., WILMANSKA D.
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1981, 13, 155-160.
- [113] TANAKA A., SONOMOTO K., HOQ M.M., USUI N., FUKUI S., NOMURA K.
Hydroxylation of Steroids by immobilized microbial cells. In : *Enzyme Engineering*.
1982 (Recd 1984), 0, 131-133.
- [114] ERGAN F., ATRAI P., DHULSTER P., GELLF G., LEGOY M.D., KIM M.N.
Zeitung Allg. Mikrobiol. 1982, 22 (9), 607-615.
- [115] BIHARI V., GOSWAMI P.P., RIZVI S.H.M., KHAN A.W., VORA V.C.
BASU S.K. *Biotechn. Bioeng.* 1984, 26, 1403-1408.
- [116] MAJERUS F., PAREILLEUX A. *Bioechnol. Letters*. 1986, 8(12), 863-866.
- [117] SCHUBERT F., KIRSTEIN D., SCHELLER F., MOHR P. *Anal. Lett.*
1980, 13 (B13), 1167-1178.
- [118] TRINCI A.P.J. *Archiv. für Mikrobiologie*. 1970 , 73, 353-367.
- [119] THOM , CHURCH. *Mycologia*. 1959, 51, 411-413.
- [120] BROWN D.E. *Methods in Microbiology*. 1970, 2, 173-174.
- [121] GADEN Jr.J.L. *Sci. Reports. 1st Super Sanita*. 1961, 1, 161-170.
- [122] MARSHECK W.J.Jr. *Progress. Industr. Microbiol.*, 1971, 10, 51-103.
- [123] SMITH R.V., ROSAZZA J.P. *J. Nat. Prod.* 1983, 46, 79-91.
- [124] CHIEN M.M., ROSAZZA J.P. *Appl. Environn. Microbiol.* 1980, 40, 741-745.
- [125] BRAUER H., SUCKER D. *Ger. Chem. Eng.* 1979, 2 (2), 77-86.

- [126] ARCHELAS A., FURSTOSS R., STAIRI D., MAURY G. *Bull. Soc. Chim. France*. 1986, 2, 234-238.
- [127] ARCHELAS A., FOURNERON J.D., FURSTOSS R. *J. Org. Chem.* 1988, 53, 1797-1799.
- [128] IIDA M., MIKAMI A., YAMAKAWA K., NISHTANI K. *J. Ferment. Technol.* 1988, 66 (1), 51-55.
- [129] MITARD A., RIBA J.P. *Biotechn. Bioeng.* 1988, 32, 835-840.
- [130] PENASSE L. Enzyme Technology : Use of Bioconversion in the Pharmaceutical Industry. Colloque Franco-Chinois sur la Bioechnologie. Tapei - Taiwan. Décembre 1985. Communication.
- [131] OZAKI H., KUBOTA K., TAKAHASHI H. *Agric. Biol. Chem.* 1987, 51 (9), 2503-2508.
- [132] SCHUTTE H., KULA M.R. *Enzyme Microb. Technol.*, 1988, 10, 551-558.
- [133] HUMMEL W., KULA M.R. *J. Microbiol.* 1989, 9, 201-209.
- [134] PAUTET F., BARRET R., DAUDON M. *Pharmazie*. 1985, 40(3), 202-203.
- [135] MAISSANT J.M., BODROUX J.M., BOUCHOULE C., BLANCHARD M. *J. Molec. Cat.* 1989, 237-240.
- [136] MIMOUN H., SHUSSINE L., DAIRE E., POSTEC M., WEISS R., FISCHER F. *J. am. Chem. Soc.* 1983, 105, 3101-3110.
- [137] BONCHIO M., CONTE J., DI FURIA F., MODENA G. *J. Org. Chem.* 1989, 54, 4368-4371.
- [138] ROBERT A., MEUNIER B. *New. J. Chem.* 1988, 12, 885-896.
- [139] TROST B.M., BRASLAU R. *J. Org. Chem.* 1988, 53, 532-537.
- [140] FENTON H.J.H. *J. Chem. Soc.* 1894, 65, 899-910.

- [141] GROVES J.T., VAN DER PUY M. *J.Am.Chem.Soc.* 1976, 98, 5290-5297.
- [142] BATTIONI R., PRENAUD J.P., BARTOLI J.F., REINA-ARTILES M. MANSUY D., FORT M. *J.Am.Chem.Soc.* 1988, 110, 8462-8470.
- [143] ZIMMER H., LAUKIN D.L., HORSAN S.W. *Clinical Reviews.* 1971, 71(8), 229-246.
- [144] UENO Y. *Pharmazie.* 1986, 41(7), 511.
- [145] BELLON P., CANAL P., BERNADOU J., SOULA G. *J. Chromatogr.* 1984, 309, 170-176.
- [146] MUZARD G., LE PECQ J.B. *J. Chromatogr.* 1979, 169, 446-452.
- [147] WAJCMAN H., ROCHETTE J. Utilisation de la chromatographie liquide haute-performance pour la séparation des peptides et des protéines. In Technologies de purification des protéines. Paris, Oct. 1984. 1985, 249-258.
- [148] BYKADI G., FLORA K.P., CRADOCK J.C., POOCHIKIAN G.K. *J. Chromatogr.* 1982, 231, 137-144.
- [149] LEVIN S., GRUSHKA E. *Anal. Chem.* 1986, 58, 1602-1607.
- [150] MEUNIER G, MEUNIER B. *J.Biol. Chem.* 1985, 260(19), 10576-10582.
- [151] ALLINGER N.L., LEBER C.A., STEVENS C.L. "Chimie organique". Mac Grawhill Ed. Ediscience. Paris. 1975.
- [152] ANSELL M.F., GOSDEN A.F. *Chem. Comm.* 1965, 520.
- [153] NAPOLITANO A., CORRADINI M.G., PROTA G. *Tetrahedron.* 1987 43 (12), 2749-2754.
- [154] VERBIESE-GENARD N., KAUFMANN J.M., HANOCQ M., MOLLE L. *J. Electroanal. Chem.* 1984, 170, 243-254.
- [155] PETROVA M.F., KAVERINA N.S., YAGUZHINSKII L.S. *Khim. Geter. Soedinemii.* 1971, 8, 1058-1061.

- [156] PEREZ-REYES E., MASON P. *J. Biol. Chem.*, 1981, 256 (5), 2427-2432.
- [157] CHAVANNE M., BEAUDOIN G.J., JULLIEN A., FLAMAND E. "Chimie organique expérimentale". Modula Ed. Mont-Royal (Canada), 1986.
- [158] BELLAMY L.J. "The Infra-red Spectra of complex Molecules". Chapman & Hall, London. 1975.
- [159] ZALAI K., TROMPLER A., LINDMAYER E., TERDY L., BESZEDICS G. KELEMEN A. Procédé pour l'extraction de bouillons de fermentation non filtrés. Brevet, France, n° 2 496 123, 1981.
- [160] DUPONT J., DODIN G., SCHWALLER M.-A. *Plant Science Letters*. 1988, 54, 109-115.
- [161] HOLLAND H.L., MUNOZ B., JONES T.R.B. *Bioorganic Chemistry*. 1988, 16, 388-393.
- [162] SUNDARAMOORTHY R., KANSAL V.K., DAS B.C., POTIER P. *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 1986, 371-372.
- [163] UDENFRIED S., CLARCKE C.T., AXELROD J., BRODIE B.B. *J.am.Chem.Soc.*, 1954, 208, 731-750.
- [164] NEE N.W., BRUICE T.C. *J.am.Chem.Soc.*, 1982, 104, 6123-6125
- [165] LEDON N.J., DURBUT P., VARESCON F. *J.am.Chem.Soc.*, 1981, 103, 2601-2602.

ANNEXES



ANNEXE I

TABLEAU RECAPITULATIF DES CONDITIONS DE CULTURE.

CONDITIONS OPERATOIRES	QUANTITE (g.l ⁻¹)	
	ERLENMEYERS	FERMENTEURS
<u>Milieu de culture :</u> D (+) Glucose anhydre pur : Extrait de soja : Extrait de levure : NaCl : KH ₂ PO ₄ : pH ajusté à 5,6 (à l'aide d'HCl 0,1N) Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. Pénicilline-Streptomycine 50 000 UI. <u>Paramètres de fermentation:</u> Température Agitation Aération	20 5 5 5 5 2 p.1000 24°C 190 rpm -	10 à 30 5 5 5 5 2 p.1000 24°C 0,5 à 0,65 Hz 0,70 à 2,53 m ³ .h ⁻¹

ANNEXE II

SYMBOLES UTILISES SUR LA FIGURE II.14

Symbole	Allemand	Français
M :	Motor	Moteur
GT :	Getriebe	Bielle
KT :	Kurbeltrieb	Roue d'entraînement
SZ :	Substratzugabe	Introduction du substrat
RK :	Rückflusskühler	Condenseur
SF :	Schaumfalle	Séparateur de mousse
LF :	Sterilfilter (Keramik)	Filtre stérile (céramique)
LA :	Luftabfuhr	Sortie d'air
AS :	Antischaummitteldosierung	Doseur d'anti-mousse
FF :	Sterilfilter	Filtre stérile
FB :	Faltenbalg	Soufflet en caoutchouc
IZ :	Inoculumzugabe	Introduction de l'inoculum
DP :	Deckelplatte	Couvercle
TH :	Thermostat	Thermostat
HS :	Hubstange	Tige verticale
HR :	Hubstrahlbioreaktor	Réacteur "pulsé"
LS :	Lochscheiben	Disques troués
GZ :	Glaszylinder	Cylindre en verre
RM :	Rundmantel	Enveloppe plastique
BP :	Bodenplatte	Fond du réacteur
FP :	Flüssigprobenentnahme	Prise d'échantillons liquides
GP :	Gasprobenentnahme	Prise d'échantillons gazeux
LZ :	Luftzufuhr	Arrivée d'air
VF :	Vorfilter	Préfiltre
DM :	Druckminderer	Manomètre réducteur de pression
V(x) :	Ventil	Clapet

	<u>Meßstellen</u>	<u>Emplacement des mesures</u>
PI :	Manometer	Manomètre
FI :	Durchflußmessung	Débitmètre
QIC :	Messung pH-Wert	pHmètre
QI :	Sauerstoffmessung	Mesure d'oxygène
SI :	Frequenzmessung	Mesure de la fréquence
TIC :	Temperaturkontrolle	Contrôle de la température

Titre

BIOCONVERSION FONGIQUE.

Application à la production d'un agent antitumoral : la 9-hydroxy ellipticine.

Mots-clés

Ellipticine

Bioconversion

Analyse

9-hydroxy ellipticine

Oxydation

Agent antitumoral

Champignons

Résumé

La synthèse chimique de la 9-hydroxy ellipticine à partir de l'Ellipticine, alcaloïde indolique dont la forme quaternisée a montré une activité remarquable contre certaines formes de tumeurs, est de faible rendement et de coût élevé. La recherche d'une autre voie de production nous a conduit à utiliser le système enzymatique du cytochrome P-450 présent au sein de champignons filamenteux. Nous avons donc développé un procédé d'oxydation enzymatique de l'Ellipticine en utilisant les souches fongiques *Aspergillus alliaceus* et *Cunninghamella echinulata*.

Après avoir déterminé les conditions optimales d'extraction des composés puis réalisé le dosage de ces substances par chromatographie sur couche mince et chromatographie liquide, nous proposons un mécanisme réactionnel explicitant l'oxydation du dérivé 9-hydroxylé en plusieurs composés *in vitro*. De façon à doser ces dérivés oxydés, nous avons mis au point une méthode colorimétrique.

Par rapport au procédé décrit dans la littérature, notre méthode permet de réduire le temps de culture nécessaire de moitié pour une production de 9-hydroxy ellipticine doublée sur des cultures effectuées au laboratoire. Les essais réalisés sur un fermenteur "pulsé" d'un nouveau type permettent de diviser par 4 le temps de culture pour une production de 9-hydroxy ellipticine triplée.

L'oxydation chimique biomimétique de l'Ellipticine par le "sel de Fremy" conduit à la formation de 9-oxo ellipticine. L'oxydation de l'Ellipticine en position 9 semble donc se faire de façon plus spécifique et dans des conditions plus douces au sein d'un système fongique.

La bioconversion de l'Ellipticine en un dérivé 9-hydroxylé, démontrée au laboratoire sur des cultures et appliquée dans un réacteur pulsé, est donc susceptible de remplacer la synthèse chimique. L'étude de pré faisabilité industrielle faite confirme ce résultat.